

**PENGARUH PEMBERIAN SALEP EKSTRAK AMPAS APEL  
MANALAGI (*Malus sylvestris* Mill) TERHADAP EKSPRESI  
IL-6 DAN JUMLAH SEL RADANG SEBAGAI  
PENYEMBUHAN LUKA INSISI  
PADA HEWAN COBA TIKUS  
(*Rattus norvegicus*)**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**RENATHA CAESAR APRILIA**  
**135130101111057**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN SALEP EKSTRAK AMPAS APEL MANALAGI  
(*Malus sylvestris* Mill) TERHADAP EKSPRESI  
IL-6 DAN JUMLAH SEL RADANG SEBAGAI PENYEMBUHAN LUKA  
INSISI  
PADA HEWAN COBA TIKUS  
(*Rattus norvegicus*)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:  
**RENATHA CAESAR APRILIA**  
135130101111057



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN SALEP EKSTRAK AMPAS APEL MANALAGI (*Malus sylvestris* Mill) TERHADAP EKSPRESI IL-6 DAN JUMLAH SEL RADANG SEBAGAI PENYEMBUHAN LUKA INSISI PADA HEWAN COBA TIKUS (*Rattus norvegicus*)**

Oleh:  
**Renatha Caesar Aprilia**  
**135130101111057**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 17 Januari 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

**Dr. Dra. Herawati, MP**  
NIP. 19580127 198503 2 001

Pembimbing II

**Drh. Dian Vidiastuti, M.Si**  
NIP. 19820207 200912 2 003

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Renatha Caesar Aprilia

NIM : 135130101111057

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Ampas Apel Manalagi (*Malus Sylvestris* Mill) Terhadap Ekspresi *Interleukin 6* (IL-6) Dan Jumlah Sel Radang Sebagai Penyembuhan Luka Insisi Pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaksud di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 17 Januari 2018

Yang menyatakan

(Renatha Caesar Aprilia)

NIM. 135130101111057

## DAFTAR RIWAYAT HIDUP



### PERSONAL DETAIL

Name	Renatha Caesar Aprilia
Place of birth	Bandar Lampung
Date of birth	April, 7 <sup>th</sup> 1995
Gender	Female
Religion	Islam
Marital Status	Single
Address 1	Jl. Slamet Riyadi IV No. 39 Kelurahan Bumi Raya, Kecamatan Bumi Waras, Bandar Lampung. Kode Pos 35228
Phone (mobile)	085368792300
Email- Address	nathacaesar@gmail.com <a href="mailto:arnes.mardasella@gmail.com">mailto:arnes.mardasella@gmail.com</a>
Nationality	Indonesian



### FORMAL EDUCATION

Level	Place	Period
Kinder garten	Taman Kanak-Kanak (TK) Roudhlotul Athfal (RA) Perwanida I, Bandar Lampung.	2000-2002
Elementary School	SDN 2 Rawa Laut Bandar Lampung	2002-2008
Junior High School	SMP N 25 Bandar Lampung	2008-2011
Senior High School	SMAN 10 Bandar Lampung	2011-2013
College	Fakultas Kedokteran Hewan UB, Malang	2013-2018

**PENGARUH PEMBERIAN SALEP EKSTRAK AMPAS APEL MANALAGI (*Malus sylvestris* Mill) TERHADAP EKSPRESI IL-6 DAN JUMLAH SEL RADANG SEBAGAI PENYEMBUHAN LUKA INSISI PADA HEWAN COBA TIKUS (*Rattus norvegicus*)**

**ABSTRAK**

Luka insisi yaitu suatu keadaan yang ditandai dengan rusaknya jaringan karena irisan benda bertepi tajam, seperti pisau, silet, dan sejenisnya. Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) memiliki kandungan zat aktif yaitu flavonoid sebagai anti inflamasi dan vitamin c dalam membantu proses regenerasi jaringan, sehingga mempercepat waktu penyembuhan dengan pembentukan kolagen pada jaringan ikat, pembentukan membran basalis dan matriks antar sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian salep ekstrak ampas apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) terhadap ekspresi interleukin-6 (IL-6) dan gambaran sel radang luka insisi selama proses penyembuhan luka. Hewan coba yang digunakan 20 ekor tikus putih strain wistar umur 8-12 minggu, dengan berat badan 150-250 gram, dibagi 5 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan terapi salep ekstrak ampas apel Manalagi masing masing konsentrasi 25%, 35%, dan 45%. Data kuantitatif dianalisa statistik ANOVA dilanjutkan uji Tukey  $\alpha = 0,05$ . Hasil penelitian menunjukkan bahwa salep ekstrak ampas apel manalagi secara signifikan ( $p < 0,05$ ) menurunkan ekspresi IL-6 dan menurunkan jumlah sel radang pasca luka insisi. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu salep ekstrak ampas apel manalagi konsentrasi 45% mampu dalam mendukung proses penyembuhan luka insisi.

**Kata kunci:** Luka insisi, Ampas Apel Manalagi, Flavonoid, Vitamin C, IL-6, Sel Radang

**EXPRESSION OF IL-6 AND AN AMOUNT OF INFLAMMATORY CELLS ON  
INCISION WOUND HEALING PROCESS AFTER TREATMENT WITH THE  
EXTRACT OF MANALAGI'S APPLE PULP  
OINTMENT IN RATS  
(*Rattus norvegicus*)**

**ABSTRACT**

Incision wound is a condition where the continuity of tissues is damaged by trauma of sharp object, such as a knife, a razor blade, and the others. Manalagi Apple (*Malus sylvestris* Mill) contain an active substance which is flavonoid as an anti-bacterial and vitamin C for regeneration of tissue, thus the recovery with formation of the collagen in connective tissue, the formation of basal membranes and matrix between cells. The aim of this research is to know the effect of apple pulp Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) ointment on expression of interleukin-6 (IL-6) and incision inflammatory cell image during wound healing process. The research subjects were twenty male rats wistar strain aged 8-12 weeks, weight 150-250 gram divided to five groups : negative control, positive control, experimental group (rats with incision wound and given extract apple pulp ointment each concentrations are 25%, 35%, and 45%). The results of IL-6 expression were observed using immunohistochemistry and the amount of inflammatory cells using HE staining. Quantitative data analysis of interleukin 6 (IL-6) expression and inflammatory cell expression using one-way ANOVA test and if there is a significant difference followed by Tukey test  $\alpha = 0.05$ . This result of this study discovered that extract apple pulp ointment therapy significantly ( $p < 0,05$ ) decrease IL-6 expression and decrease inflammatory cells. The conclusion of this study is extract apple pulp manalagi each concentrations 45% can be used as an good treatment for incision wound healing.

**Keywords:** Incision Wound, Apple Pulp Manalagi, Flavonoid, Vitamin C, IL-6, Inflammatory Cells



## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadapan Allah SWT yang melimpahkan rahmat, taufiq dan hidayah-Nya. Sholawat dan salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Agung Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan proposal skripsi yang berjudul "**Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Ampas Apel Manalagi (*Malus Sylvestris* Mill) Terhadap Ekspresi IL-6 Dan Jumlah Sel Radang Sebagai Penyembuhan Luka Insisi Pada Tikus (*Rattus Norvegicus*)**" dengan lancar.

Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang membantu membimbing, memotivasi dan memperlancar dalam menyelesaikan Pembuatan proposal skripsi ini, secara khusus penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dra. Herawati, MP selaku dosen pembimbing pertama yang telah berkenan memberikan bimbingan, waktu, kesabaran, motivasi dan membantu dalam penulisan proposal skripsi ini
2. drh. Dian Vidiastuti, M. Si selaku dosen pembimbing kedua yang telah berkenan memberikan bimbingan, waktu, kesabaran, motivasi dan membantu dalam penulisan proposal skripsi ini.
3. drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen penguji pertama yang telah berkenan memberikan tanggapan, masukan, kritik dan saran untuk menyempurnakan penulisan proposal skripsi ini.
4. drh. M. Arfan Lesmana, M.Sc selaku dosen penguji kedua yang telah berkenan memberikan tanggapan, masukan, kritik dan saran untuk menyempurnakan penulisan proposal skripsi ini.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES sebagai dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan FKH UB.
6. Keluarga besar penulis, Mama tercinta Utami Devi, adik tercinta Julia Clarisa, Bunda Desy Andrian S.Tr Keb, Ayah Doddy Litelnoni, Tante Ika, Mukti Friyan Aditama S.T, dan semua



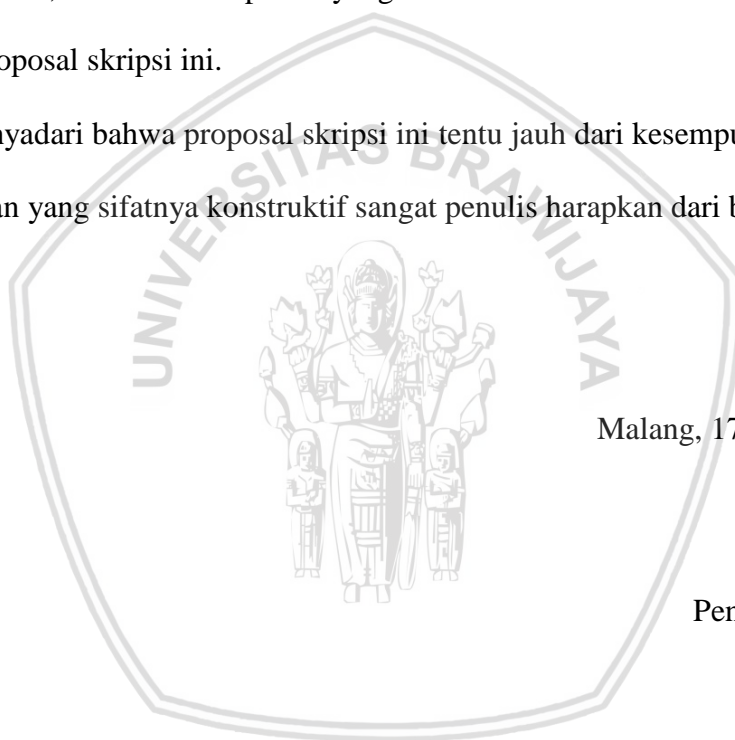
keluarga besar penulis atas pengorbanan yang sangat luar biasa baik waktu, kasih sayang maupun materi, kesabaran, doa, dorongan, nasehat, bimbingan dan pembelajaran hidup mengenai keikhlasan dan kesabaran sebagai bekal kesuksesan penulis.

7. Rekan-rekan satu tim penelitian Nella Rachmawati, dan Nurul Marie Currie yang telah bekerja dan berjuang bersama dalam penelitian ini.
8. Sahabat sekaligus keluarga penulis di Malang, “Kopi Everywhere”, Dinda Adinda, Nurmaulida Hasanah, serta semua pihak yang telah membantu dan menyemangati dalam menyelesaikan proposal skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa proposal skripsi ini tentu jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang sifatnya konstruktif sangat penulis harapkan dari berbagai pihak.

Malang, 17 Januari 2018

Penulis



## DAFTAR ISI

SKRIPSI.....	49
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI .....	50
LEMBAR PERNYATAAN.....	51
ABSTRAK.....	53
EXPRESSION OF IL-6 AND AN AMOUNT OF INFLAMMATORY CELLS ON INCISION WOUND HEALING PROCESS AFTER TREATMENT WITH THE EXTRACT OF MANALAGI'S APPLE PULP .....	54
OINTMENT IN RATS .....	54
ABSTRACT.....	54
KATA PENGANTAR .....	55
DAFTAR ISI.....	57
DAFTAR TABEL.....	58
DAFTAR GAMBAR.....	59



## DAFTAR TABEL

### Tabel

No table of figures entries found.  
 No table of figures entries found.  
 No table of figures entries found.  
 No table of figures entries found.

### Halaman



## DAFTAR GAMBAR

No	Gambar	Halaman
	<p>No table of figures entries found.1</p> <p>No table of figures entries found.</p> <p>No table of figures entries found.</p>	
	<p>table of figures entries found.</p>	





## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Luka adalah suatu keadaan yang ditandai dengan kontinuitas jaringan rusak karena trauma benda tajam atau tumpul, perubahan suhu, kimiawi, listrik, radiasi, atau gigitan hewan (Ariani dkk., 2013). Etiologi dari luka bermacam-macam yaitu trauma, luka bakar, gigitan binatang atau serangga, tekanan, tarikan, penyakit vaskuler, defisiensi nutri, dan efek samping dari obat (Candra dan Budiman, 2017). Luka insisi dapat disebabkan kecelakaan maupun karena perlakuan medis, contohnya operasi. Pada saat terjadi luka, tubuh secara normal berusaha memperbaiki jaringan yang rusak dengan cara menimbulkan respon terhadap cedera yang dikarakteristikan adanya bengkak, kemerahan, panas, nyeri, dan kerusakan fungsi (David, 2007).

Proses penyembuhan luka, terdiri dari tiga fase yaitu fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase maturasi. Pada fase inflamasi awal terjadinya luka terjadi pembengkakan dan nyeri. Hal tersebut mendorong munculnya sel radang. Fase proliferasi dimulai sekitar hari ke 4 setelah luka. Proliferasi dapat diamati dengan pembentukan jaringan granulasi pada luka yang merupakan kombinasi dari elemen seluler termasuk fibroblas dan sel inflamasi. Pada fase maturasi, berlangsung dari hari ke 7 segera setelah matriks ekstrasel terbentuk, dimulailah reorganisasi (Triyono, 2005).

Apel dikonsumsi sebagai buah segar maupun produk olahan. Sebagai produk olahan (sari apel, keripik apel dan buah kaleng), apel menyisakan limbah berupa kulit dan ampas yang kebanyakan dijadikan makanan ternak, pupuk, atau dibuang (Subagyo, 2010). Kandungan flavonoid dalam buangan ampas apel tersebut dapat dimanfaatkan sebagai limbah yang berguna untuk obat alternatif. Salah satu herbal yang diduga mengandung zat aktif untuk dijadikan alternatif obat penyembuh luka adalah apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill). Zat aktif yang terkandung dalam apel

Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) adalah flavonoid dan vitamin C yang dapat menunjang kesembuhan luka. Ekstrak Apel Manalagi mempunyai kandungan zat aktif lain yaitu tannin, flavonoid, dan pektin bersifat sebagai anti bakteri dengan cara menghambat pertumbuhan *Streptococcus alpha* mulai konsentrasi 40% (Abiyadi, 2005).

Flavonoid adalah senyawa fitokimia, zat aktif yang ada didalam flavonoid, antara lain adalah *kuersetin* dan *phloridzin*. Flavonoid dan turunannya memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi yang dapat mengurangi rasa sakit apabila terjadi luka. Inflamasi merupakan respon normal ketika terjadi cedera pada tubuh, namun perpanjangan fase inflamasi akan memperlambat proses epitelisasi pada luka sehingga menghambat fase *remodelling* dan sintesa matriks, terlambatnya penutupan luka dan meningkatnya nyeri (Tsala, 2013; Arun, 2013). Apel juga berfungsi sebagai antioksidan sehingga dapat mengurangi oksidasi lipid dan meningkatkan vaskularisasi luka (Bhowmik, *et al.*, 2012).

Fase inflamasi ditandai dengan banyaknya sel radang seperti polimorfonuklear yang muncul setelah terjadi luka dan sel mononuklear di jaringan yang menandakan reaksi imun akut. Berbagai macam sitokin diproduksi akibat adanya respon antigen dan mikroba maupun inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL- $\beta$ , dan TGF- $\beta$ . Sitokin tersebut bersama faktor pertumbuhan seperti PDGF, FGF aktif berperan dalam proses penyembuhan luka (Mulyata, 2002). Interleukin-6 adalah sitokin multifungsi yang awalnya ditandai regulator kekebalan tubuh dan respon inflamasi. Semakin maksimal aktivitas sitokin IL-6 yang dilepaskan oleh makrofag, maka proses pembersihan luka akan semakin baik (Kumar, *et al.*, 2005).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, penelitian ini yang bertujuan untuk mengetahui khasiat ekstrak ampas apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) yang diformulasikan dalam sediaan salep sebagai terapi topikal pada luka.



## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut :

- 1) Apakah pemberian salep ampas apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) berpengaruh terhadap penurunan kadar IL-6 pada tikus (*Rattus norvegicus*) pasca insisi?
- 2) Apakah pemberian salep ampas apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) berpengaruh terhadap penurunan jumlah sel radang pada tikus (*Rattus norvegicus*) pasca insisi?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

- 1) Hewan model yang akan digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar dengan umur 8-12 minggu dan berat badan 150-250 gram. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 726-KEP-UB.
- 2) Pembuatan keadaan pasca insisi pada hewan model tikus dilakukan dengan cara melakukan insisi sepanjang 3 cm dan mencapai subkutan (Ramdani, 2014)
- 3) Ampas apel didapatkan dari Pabrik Sari Apel Dewata yang berlokasi di Kota Batu dan ampas yang digunakan adalah ampas apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill).
- 4) Pembuatan salep ampas Apel Manalagi (*Malus sylvestris mill*) dilakukan dengan pencampuran ampas Apel Manalagi (*Malus sylvestris mill*) yang telah ekstraksi dengan *Pulvis Gummy Arabicum* (PGA) dan vaselin album dengan konsentrasi ekstrak masing-masing 25%, 35%, 45% (Wulandari, 2012).

- 5) Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi IL-6 dengan menggunakan metode Imunohistokimia dan gambaran histopatologi kulit menggunakan pewarnaan HE.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan penelitian ini adalah :

- 1) Mengetahui pengaruh pemberian salep ampas apel Manalagi (*Malus syveltris* Mill) terhadap penurunan ekspresi IL-6 pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) pasca insisi.
- 2) Mengetahui pengaruh pemberian salep ampas apel Manalagi (*Malus syveltris* Mill) terhadap penurunan jumlah sel radang hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) pasca insisi.

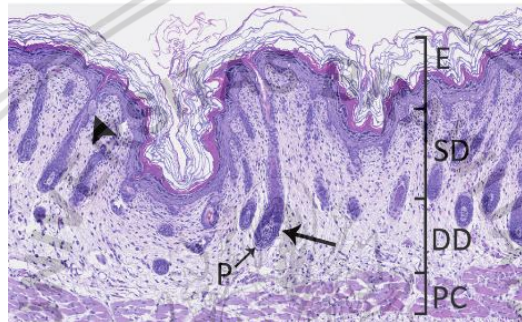
#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini bermanfaat untuk membuktikan bahwa salep ampas apel Manalagi dapat digunakan sebagai kandidat terapi luka insisi.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Anatomi Kulit

Kulit terdiri atas epidermis, yaitu lapisan epitel yang berasal dari ektoderm, dan dermis yang berasal dari mesoderm. Turunan epidermis meliputi rambut, kuku, kelenjar sebacea, dan kelenjar keringat. Hipodermis atau jaringan subkutan terdapat dibawah dermis yang merupakan jaringan ikat longgar mengandung sel adiposit. Jaringan subkutan mengikat kulit secara longgar pada jaringan di bawahnya dan sesuai dengan fasia superfisial pada anatomi makro (Mescher, 2002).



**Gambar 2.1** Struktur dan Anatomi Kulit Tikus (Parker dan Picut, 2016).

#### 2.1.1 Epidermis

Epidermis terdiri atas epitel berlapis gepeng berkeratin yang disebut keratinosit. Tiga jenis sel epidermis yang jumlahnya lebih sedikit juga ditemukan; melanosit, sel langerhans penyaji-antigen, dan sel Merkel atau sel taktil epitelial. Epidermis terdiri atas lima lapisan keratinosit, kelima lapisan di kulit tebal (Qomariah, 2014).

##### a. Lapisan basal (*stratum basale*)

Lapisan basal (*stratum basale*) terdiri atas selapis sel kuboid atau kolumnar basofilik yang terletak di atas membran basal pada perbatasan epidermis-dermis. *Stratum basale* ditandai dengan tingginya aktivitas mitosis dan bertanggung jawab, bersama dengan bagian awal lapisan berikutnya atas produksi sel sel epidermis secara bersinambungan (Mescher, 2002). *Stratum basale* berisi sel punca (sel yang membelah dan memperbaharui populasi sel punca serta menghasilkan sel

keratinosit), sel keratinosit (sel ini membelah 3-6 kali sebelum bergerak ke atas menuju stratum spinosum dengan bentuk kuboid dan sitoplasma merah muda serta nukleus ungu muda), serta melanosit (sel penghasil pigmen dengan ciri sitoplasma pucat atau jernih dan nukleus ungu gelap atau basofilik) (Juncqueira dan Carneiro, 2005).

b. Lapisan spinosa (*stratum spinosum*)

Lapisan spinosa (*stratum spinosum*) yang lapisan epidermis paling tebal, terdiri atas sel sel kuboid atau agak gepeng dengan inti di tengah dengan nukleolus dan sitoplasma yang aktif mensintesis filamen keratin. Tepat di atas lapisan basal, sejumlah sel masih membelah dan zona kombinasi ini terkadang disebut stratum germinativum (Mescher, 2002).

c. Lapisan granular (*stratum granulosum*)

Lapisan granular (*stratum granulosum*) terdiri atas dua atau tiga lapis sel keratinosit berbentuk pipih dengan sitoplasma berbutir kasar serta intinya mengerut (Juncqueira dan Carneiro, 2005). Sitoplasmanya berisikan massa basofilik intens yang disebut granul keratohialin. Struktur tersebut tidak berikatan dengan membran dan terdiri atas massa filaggrin dan protein lain yang berhubungan dengan keratin tonofibril yang menghubungkannya dengan struktur sitoplasma besarpada proses keratinisasi yang penting (Mescher, 2002).

d. *Stratum corneum*

*Stratum corneum*, terdiri atas 20 lapis sel gepeng berkeratin tanpa inti dengan sitoplasma yang dipenuhi keratin filamentosa birefringen. *Stratum corneum* adalah lapisan kulit yang paling luar, tidak berinti, dan protoplasmanya telah berubah menjadi keratin (zat tanduk).

### 2.1.2 Dermis

Dermis adalah jaringan ikat yang menunjang epidermis dan mengikatnya pada jaringan subkutan (hipodermis). Permukaan dermis sangat irregular dan

memiliki banyak tonjolan (papila dermis) yang saling mengunci dengan juluran epidermis (rabung epidermis). Membran basal dijumpai antara stratum basale dan lapisan papilar dermis dan mengikuti kontur interdigitasi antara kedua lapisan tersebut (Ahliadi, 2014). Membran basal merupakan struktur majemuk yang terdiri atas lamina basal dan lamina retikular dan biasanya dapat terlihat dengan mikroskop cahaya. Dermis terdiri atas dua lapisan dengan batas yang tidak nyata : lapisan papilar di luar dan lapisan retikular lebih dalam. Lapisan papilar tipis terdiri atas jaringan ikat longgar, dengan fibroblas dan sel jaringan ikat lainnya, seperti sel mast dan makrofag. Leukosit yang keluar dari pembuluh (ekstravasasi) juga dijumpai. Lapisan ini, fibril penambat dari kolagen tipe VII menyelip ke dalam lamina basal dan mengikat dermis pada epidermis. Lapisan retikular lebih tebal, terdiri atas jaringan ikat padat iregular, dan memiliki lebih banyak serat dan lebih sedikit sel daripada papilar. Dermis merupakan tempat turunan epidermis berupa folikel rambut dan kelenjar (Perdanakusuma, 2007).

### **2.1.3 Jaringan Subkutan**

Lapisan subkutan terdiri atas jaringan ikat longgar yang mengikat kulit secara longgar pada organ organ di bawahnya, yang memungkinkan kulit bergeser di atasnya. Lapisan tersebut, juga disebut hipodermis atau fascia superficialis, sering mengandung sel sel lemak yang jumlahnya bervariasi sesuai daerah tubuh dan ukuran yang bervariasi sesuai dengan status gizi. Suplai vaskular yang luas di lapisan subkutan meningkatkan ambilan insulin dan obat yang disuntikkan kedalam jaringan ini secara cepat.

## **2.2 Luka**

Luka merupakan gangguan kontinuitas kulit, membran mukosa dan tulang atau organ lain (Kozier, 2004 dalam Sartika dan Setyoadi 2010). Luka adalah keadaan dimana kontinuitas jaringan rusak oleh karena trauma dari benda tajam atau tumpul, perubahan suhu, kimiawi, listrik, radiasi, atau gigitan hewan. Tubuh akan

berusaha untuk memperbaiki jaringan yang rusak melalui mekanisme penyembuhan luka, sebagai respon dari kerusakan jaringan tersebut (Durry dkk, 2013).

Menurut Sutawijaya (2010) dalam Latifa (2015), luka adalah putusnya kesinambungan kulit badan jaringan di bawah kulit oleh karena trauma. Ada beberapa jenis luka salah satunya adalah luka insisi atau biasa yang disebut luka sayat (*incisivum*) yaitu luka yang ditimbulkan oleh irisan benda bertepi tajam : seperti pisau, silet, parang, dan sejenisnya. Luka sayat termasuk dalam golongan luka terbuka dibuat untuk tujuan tertentu seperti operasi luka yang timbul biasanya akan berbentuk memanjang, tepi luka berbentuk lurus, akan tetapi jaringan kulit di sekitar luka tidak mengalami kerusakan. Luka diklasifikasikan dalam dua bagian yaitu luka akut dan luka kronik.

### **2.2.1 Luka akut**

Luka trauma yang biasanya segera mendapat penanganan dan biasanya dapat sembuh dengan baik bila tidak terjadi komplikasi. Kriteria luka akut adalah luka baru, mendadak, dan penyembuhannya sesuai dengan waktu yang diperkirakan. Contoh luka akut adalah luka jahit karena pembedahan, luka sayat, luka bakar, luka tusuk dan *crush injury* (Perdanakusuma, 2007).

### **2.2.2 Luka Kronik**

Luka yang berlangsung lama atau sering timbul kembali (rekuren) dimana terjadi gangguan pada proses penyembuhan yang biasanya disebabkan oleh masalah multifaktor dari penderita. Pada luka kronik, luka gagal sembuh pada waktu yang diperkirakan, tidak berespon baik terhadap terapi dan punya tendensi untuk timbul kembali. Contoh luka kronik adalah ulkus diabetes, ulkus venous (Perdanakusuma, 2007).

## **2.3 Fase Penyembuhan Luka**

Penyembuhan luka merupakan sebuah proses transisi yang merupakan salah satu proses paling kompleks dalam fisiologi manusia yang melibatkan serangkaian



reaksi dan interaksi kompleks antara sel dan mediator (Med J Indone, 2009 dalam Latifa, 2015). Proses penyembuhan luka terjadi pada awal inflamasi, terjadi perusakan, pelarutan, dan penghancuran sel atau agen penyebab kerusakan sel. Pada saat yang sama terjadi reparasi, proses pembentukan kembali jaringan rusak atau proses penyembuhan jaringan rusak. Proses ini baru selesai sempurna sesudah agen penyebab kerusakan sel dinetralkan (Triyono, 2005).

Selama proses reparasi berlangsung, jaringan rusak diganti oleh regenerasi sel parenkimal asli dengan cara mengisi bagian yang rusak dengan jaringan fibroblas. Penyembuhan luka merupakan proses terus menerus dari peradangan dan perbaikan, dimana sel sel inflamasi, epitel, endotel, trombosit, dan fibroblas keluar secara bersamaan dari tempatnya semula dan berinteraksi untuk memperbaiki kerusakan (Triyono, 2005). Menurut Perdanakusuma (2007), menyatakan penyembuhan luka adalah suatu bentuk proses usaha untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi. Komponen utama dalam proses penyembuhan luka adalah kolagen dan sel epitel. Fibroblas adalah sel yang bertanggung jawab untuk sintesis kolagen. Fisiologi penyembuhan luka secara alami akan mengalami fase fase inflamasi, proliferasi, dan *remodelling* jaringan, seperti dibawah ini :

### **2.3.1 Fase Inflamasi**

Fase Inflamasi terjadi pada hari 0-5. Proses penyembuhan terjadi akibat luka. Luka karena trauma atau luka karena pembedahan menimbulkan kerusakan jaringan dan mengakibatkan perdarahan. Pada awalnya darah akan mengisi jaringan yang cedera dan paparan darah terhadap kolagen akan mengakibatkan terjadinya degranulasi trombosit. Kemudian akan memicu sistem biologis lain seperti pengaktifan komplemen kinin, kaskade pembekuan dan pembentukan plasmin. Keadaan ini memperkuat sinyal daerah yang terluka, yang mengaktifkan pembentukan bekuan untuk menyatukan tepi luka. Pembentukan kinin dan prostaglandin menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh



darah di daerah luka. Hal ini menyebabkan edema dan kemudian menimbulkan pembengkakan dan nyeri pada awal terjadinya luka. Jumlahnya meningkat cepat dan mencapai puncaknya pada 24-48 jam. Fungsi utamanya adalah memfagositosis bakteri yang masuk. Pada penyembuhan luka normal kehadiran sel sel ini tidak begitu penting sebab penyembuhan luka dapat terjadi tanpa keberadaan sel sel ini. Adanya sel ini menunjukkan bahwa luka terkontaminasi bakteri. Bila tidak terjadi infeksi, sel sel PMN berumur pendek dan jumlahnya menurun dengan cepat hingga hari ketiga (Triyono, 2005).

Elemen imun seluler yang berikutnya adalah makrofag. Sel ini turunan dari monosit yang bersirkulasi, terbentuk karena proses kemotaksis dan migrasi. Muncul pertama 48-96 jam setelah terjadi luka dan mencapai puncak pada hari ke ke 3, makrofag berumur lebih panjang dibanding dengan sel PMN dan tetap ada di dalam luka sampai proses penyembuhan berjalan sempurna. Sesudah makrofag akan muncul limfosit T dengan jumlah nbermakna pada hari ke 5 dan mencapai puncak pada hari ke 7. Makrofag dan limfosit T penting keberadaannya pada penyembuhan luka normal memfagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis serta sisa jaringan. Makrofag melepas zat biologis aktif yang mempermudah terbentuknya sel inflamasi tambahan untuk membantu makrofag dalam dekontaminasi dan membersihkan sisa jaringan. Makrofag juga melepas faktor pertumbuhan dan substansi lain mengawali dan mempercepat pembentukan formasi jaringan granulasi. Zat yang berfungsi sebagai transmitter interseluler ini secara keseluruhan disebut sitokin (Triyono, 2005).

### **2.3.2 Fase Proliferasi**

Fase proliferasi dimulai sekitar hari ke 4 setelah luka dan biasanya berlangsung sampai 21 hari pada luka yang akut, tergantung pada ukuran luka dan kesehatan pasien. Hal ini ditandai dengan angiogenesis, deposisi kolagen, pembentukan jaringan granulasi, kontraksi luka, dan epitelisasi. Proliferasi diamati

berdasarkan kehadiran jaringan berbercak kemerahan atau kolagen di dasar luka melibatkan pergantian jaringan dermal dan terkadang jaringan subdermal pada luka yang lebih dalam, serta kontraksi luka (Orstred,*et al.*, 2011). Hal ini sesuai dengan pendapat dari Triyono (2005), yang menyatakan bahwa fase proliferasi ditandai dengan pembentukan jaringan granulasi pada luka merupakan kombinasi dari elemen seluler termasuk *fibroblast* dan sel inflamasi bersamaan dengan timbulnya kapilerbaru tertanam dalam jaringan longgar ekstra seluler dari matriks kolagen, fibronectin, dan asam hialuronik. *Fibroblast* muncul pertama kali pada hari ke 3 dan mencapai puncak pada hari ke 7. Peningkatan jumlah *fibroblast* pada daerah luka merupakan kombinasi dari proliferasi dan migrasi. *Fibroblast* berasal dari sel sel mesenkimal lokal, terutama yang berhubungan dengan lapisan adventisia, pertumbuhannya disebabkan oleh sitokin yang diproduksi oleh makrofag dan limfosit. *Fibroblast* merupakan elemen utama pada proses perbaikan untuk pembentukan proteins truktural yang berperan dalam pembentukan jaringan. *Fibroblast* juga memproduksi kolagen dalam jumlah besar berupa glikoprotein berantai tripel, unsur utama matriks luka ekstraseluler yang berguna membentuk kekuatan pada jaringan parut. Kolagen pertama kali dideteksi pada hari ke 3 setelah luka, meningkat sampai minggu ke 3. Kolagen terus menumpuk sampai tiga bulan. Penumpukan kolagen pada saat awal terjadi berlebihan kemudian fibril kolagen mengalami reorganisasi sehingga terbentuk jaringan reguler sepanjang luka.

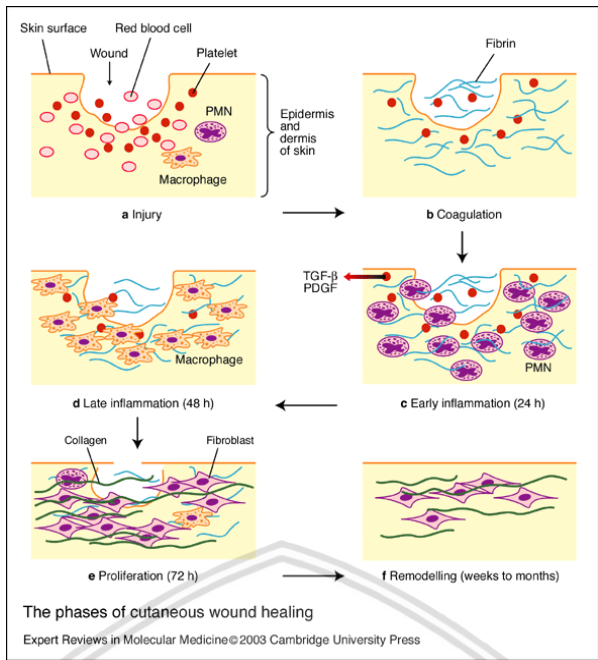
*Fibroblast* akan segera menghilang setelah matriks kolagen mengisi kavitas luka dan pembentukan neovaskular akan menurun melalui proses apoptosis. Kegagalan regulasi pada tahap inilah yang hingga saat ini dianggap sebagai penyebab terjadinya kelainan fibrosis seperti jaringan parut hipertrofik (Gurtner, 2007). Mediator pertumbuhan sel endotelial ini dan kemotaksis termasuk sitokin yang dihasilkan trombosit, makrofag dan limfosit pada luka, tekanan oksigen yang rendah, asam laktat dan amin biogenik. Sitokin merupakan stimulan potensial untuk

pembentukan formasi baru pembuluh darah termasuk *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *acidic FGF* (aFGF), *transforming growth factor  $\alpha/\beta$*  (TGF $\alpha/\beta$ ) dan *epidermal growth factor* (eFGF) (Triyono, 2005). Makrofag akan menghasilkan *growth factor* seperti PDGF dan TGF- $\beta$  yang akan menginduksi fibroblas untuk berpoliferasi, migrasi, dan membentuk ekstraseluler (Gurtner, 2007).

### 2.3.3 Fase Maturasi

Fase ini berlangsung dari hari ke 7 sampai dengan 1 tahun segera setelah matriks ekstrasel terbentuk, dimulailah reorganisasi. Pada mulanya matriks ekstrasel kaya akan fibronectin. Hal ini tidak hanya akan menghasilkan migrasi sel substratum dan pertumbuhan sel ke dalam tetapi juga menyebabkan penumpukan kolagen oleh fibroblas terbentuk asam hialuronidase dan proteoglikan dengan berat molekul besar berperan dalam pembentukan matriks ekstraseluler dengan konsistensi seperti gel dan membantu infiltrasi seluler. Kolagen berkembang cepat menjadi faktor utama pembentuk matrik. Sesudah 5 hari periode jeda, dimana saat ini bersesuaian dengan pembentukan jaringan granulasi awal dengan matrik sebagian besar tersusun dari fibronectin dan asam hialuronidase, terjadi peningkatan cepat dari kekuatan tahanan luka karena fibrinogenesis kolagen (Triyono, 2005).

Kejadian penyembuhan luka dapat terhambat apabila kemampuan alami jaringan untuk memperbaiki diri berkurang dan penanganan yang dilakukan terhadap luka tidak baik. Penyembuhan luka yang optimal tercapai jika tidak terjadi komplikasi dalam bentuk kekurangan ataupun kelebihan komponen penyembuhan luka terutama kolagen dan sel epitel. Pada akhir fase remodelling, jaringan baru hanya akan mencapai 70% kekuatan jaringan awal (Gurtner, 2007).



**Gambar 2.2** Fase penyembuhan luka (Beanes,*et al.*, 2003)

**2.4** Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill)

Tanaman apel dapat tumbuh hidup subur di daerah yang mempunyai temperatur udara dingin. Tanaman apel (*Malus sylvestris* Mill) diduga berasal dari sekitar Israel-Palestina, kemudian menyebar ke seluruh dunia termasuk Indonesia. Tanaman apel yang berkembang di Indonesia diperkirakan berasal dari negeri Belanda dengan pohon pangkal apel yang liar (Sastrahidayat dan Djauhari, 2003). Apel lokal Indonesia yang terkenal berasal dari Malang, Jawa Timur.

- Divisi : Spermatophyte
- Subdivisi :Angiosperma
- Klas : Dicotyledonae
- Ordo : Rosales
- Famili : Rosaceae
- Genus : *Malus*
- Species : *Malus sylvestris* Mill



**Gambar 2.3** Apel Manalagi(*Malus sylvestris* Mill)  
(Hapsaridkk, 2015)

Tanaman apel di Indonesia dapat tumbuh dan berkembang dengan baik apabila dibudidayakan pada daerah yang mempunyai ketinggian sekitar 700-1200 meter di atas permukaan laut (Sufrida, 2006 dalam Wulandari, 2014). Apel Manalagi

mempunyai rasa manis walaupun masih muda dan aromanya harum. Bentuk buahnya bulat dan kulitnya buahnya berpori putih. Diameter buah berkisar antara 5-7 cm dan berat 75-100 gram/buah (Hapsari dkk, 2015)

Salah satu khasiat buah apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) yaitu mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Abiyadi, 2005 dalam Wulandari, 2014), mengandung beberapa zat yang diketahui mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri yaitu polifenol, flavonoid, saponin, pektin dan iodium. Kulit apel mengandung flavonoid yang disebut *quercetin*. *Quercetin* ini mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi. Diketahui bahwa kandungan *quercetin* dalam apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) cukup besar yaitu sekitar 4,4 mg/100 gram (Graft,*et al.*,2005).

Pektin merupakan senyawa polisakarida yang dapat larut dalam air dan berfungsi sebagai pelindung bakteri pada luka dan melindungi tubuh dari infeksi. Kandungan pada apel tertera pada **tabel 2.1** (Sufrida, 2007).

**Tabel 2.1** Kandungan Apel per 100 gram Buah Apel

Kandungan	Jumlah
Energi	58 kal
Protein	0,3 g
Lemak	0,4 g
Karbohidrat	14,9 g
Kalsium	6 mg
Fosfor	10 mg
Serat	0,07 g
Besi	1,30 mg
Vitamin A	24 RE
Vitamin B1	0,04 mg
Vitamin B2	0,03 g
Vitamin C	5 mg
Niacin	0,1 mg

**2.5 Salep**

Salep merupakan sediaan setengah padat yang mudah dioleskan dan dapat digunakan pada kulit. Salep berbahan hidrokarbon dan memiliki efek sebagai emolien, efek oklusi, dan mampu bertahan pada permukaan kulit dalam waktu yang lama tanpa mengering (Bergstrom, 2008). Menurut Nareswari (2011), dalam sediaan



salep komposisi basis merupakan hal yang penting karena akan mempengaruhi kecepatan pelepasan obat dari basisnya secara langsung akan mempengaruhi khasiat dari obat yang dikandungnya, karena untuk dapat berkhasiat obat harus terlepas dahulu dari basis salepnya. Basis salep merupakan pembawa dalam penyiapan salep menjadi obat. Basis salep sebaiknya memiliki daya sebar yang baik dan dapat menjamin pelepasan bahan obat pada daerah yang diobati, tidak menimbulkan rasa panas, juga tidak ada hambatan pada pernafasan kulit.

Formulasi salep yang ideal harus bersifat antara lain tidak toksik, tidak mengiritasi, tidak menyebabkan alergi, tidak meninggalkan bekas dan tidak melukai. Dasar salep dapat digolongkan menjadi dasar salep berminyak (hidrokarbon), salep absorpsi, salep tercuci oleh air, dan salep larut air. Dasar salep hidrokarbon (minyak) bebas air, preparat yang berair dapat dicampurkan dalam jumlah sedikit dan dipakai untuk efek emolien (melunakkan lapisan kulit), bertahan pada kulit untuk waktu yang lama dan tidak memungkinkan hilangnya lembab ke udara. Dasar salep berminyak terdiri dari minyak hidrofob seperti; vaselin album, paraffin cair, minyak tumbuhan dan silicon (Nareswari, 2011).

Menurut Primadani (2009), vaselin putih adalah vaselin yang telah dihilangkan seluruh atau hampir seluruh warnanya, sehingga mengurangi reaksi hipersensitivitas dan lebih dipilih untuk penggunaan kosmetik dan sediaan farmasetika lain. Vaseline banyak digunakan dalam formulasi sediaan topikal sebagai basis yang bersifat emolient. Vaseline memiliki hidrokarbon siklik dan bercabang dalam jumlah yang relatif besar bila dibandingkan dengan parafin, yang bertanggung jawab terhadap karakternya yang lebih lembut dan cocok sebagai basis salep yang ideal.

Sifat fisik salep hidrokarbon (minyak) bebas air, preparat yang berair mungkin dapat dicampurkan hanya dalam jumlah sedikit, bila lebih akan sukar larut (Nareswari, 2011). Dengan demikian dibutuhkan sediaan emulsi. Emulsi adalah

suatu sistem yang tidak stabil secara termodinamika yang mengandung paling sedikit dua fase cair yang tidak bercampur, satu diantaranya di dispersikan sebagai globul dalam fase cair lain. Sistem ini dibuat stabil dengan bantuan suatu zat pengemulsi atau emulgator. Bentuk sediaan yang dipilih adalah emulsi tipe minyak dalam air (m/a), karena zat aktif yang digunakan berupa minyak dan pelarut yang digunakan adalah air (Alfauziah dan Arif, 2016). PGA (*Pulvic Gummi Arabicum*) merupakan emulgator alam yang umum digunakan dalam formulasi sediaan topikal. PGA merupakan bahan pengental dan emulgator yang efektif karena kemampuannya sebagai antioksidan (Pradata dkk, 2015).

## 2.6 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 (IL-6) adalah salah satu sitokin multifungsi yang penting dalam respon imun, pertahanan sel, apoptosis, dan proliferasi. Sebagai respon terhadap luka pada jaringan, infeksi, dan stimulus proinflamasi, IL-6 dihasilkan oleh berbagai populasi sel yang berbeda, seperti monosit sel T, sel B, sel endotel, sel otot polos, dan fibroblast (Knolle *et al.*, 1996).

Interleukin-6 merupakan sitokin yang berperan dalam sistem imun non spesifik maupun sistem imun spesifik. Sitokin ini disintesis oleh sel mononuklear, sel endotel vaskuler, fibroblas serta beberapa sitokin lain seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1. Sitokin ini juga diproduksi oleh sel T yang teraktivasi. Reseptor IL-6 terdiri dari protein *cytokine-binding* dan subunit *signal-transducing* yang merupakan reseptor sitokin tipe I. Interleukin 6 memiliki beberapa peran, dalam respon imun non spesifik (Abbas,*et al.*, 2007).

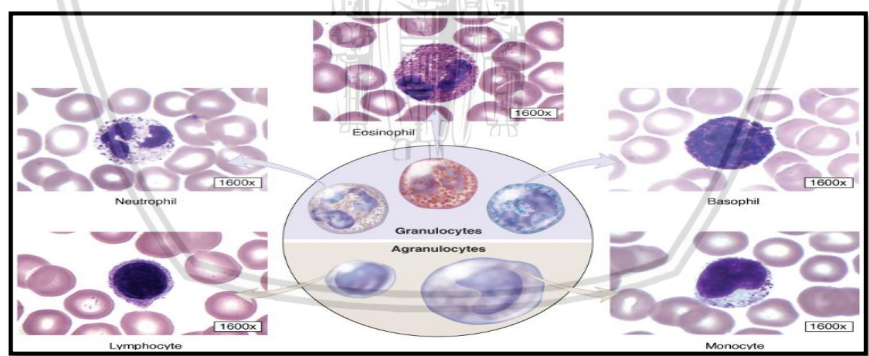
Interleukin-6 merupakan sitokin pro-inflamasi, dimana produksi berlebih sitokin ini menandakan terjadinya inflamasi. Inflamasi merupakan tahap awal dari serangkaian proses penyembuhan luka. Ketika produksi IL-6 meningkat, maka hal ini akan berdampak pada aktivasi faktor pertumbuhan sel radang.



## 2.7 Sel Radang

Radang atau inflamasi merupakan suatu mekanisme pertahanan yang dilakukan oleh tubuh untuk melawan agen asing yang masuk ke tubuh, respon cedera jaringan, trauma, bahan kimia dan lainnya. Tubuh dibekali sistem pertahanan dalam menghadapi serangan benda asing yang dapat menimbulkan infeksi atau kerusakan jaringan, salah satunya dengan keluarnya sel radang (Lawler,*et al.*, 2002) misalnya sel leukosit. Leukosit atau sel darah putih terdiri dari beberapa jenis sel seperti neutrofil, eosinofil, basofil, limfosit monosit yang berinteraksi satu sama lain dalam proses inflamasi (Effendi, 2003).

Makrofag merupakan salah satu sel radang yang berfungsi menelan dan menghancurkan semua benda atau agen infeksi seperti menghancurkan bakteri dan sel yang telah rusak. Makrofag berasal dari sel sel monosit yang mempunyai masa beredar yang singkat di dalam darah untuk masuk ke dalam jaringan (Guyton dan Hall, 2008).



**Gambar 2.4** Gambaran histopatologi sel radang (sumber : Mescher, 2010)

## 2.8 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus yang digunakan dalam penelitian ini memiliki klasifikasi sebagai berikut (Armitage, 2004) :

- Kingdom : Animalia
- Filum : Chordata
- Sub filum : Vertebrata
- Klass : Mammalia

Ordo : Rodentia  
Familia : Muridae  
Sub Familia : Murinae  
Genus : *Rattus*  
Spesies : *Rattus norvegicus* strain Wistar

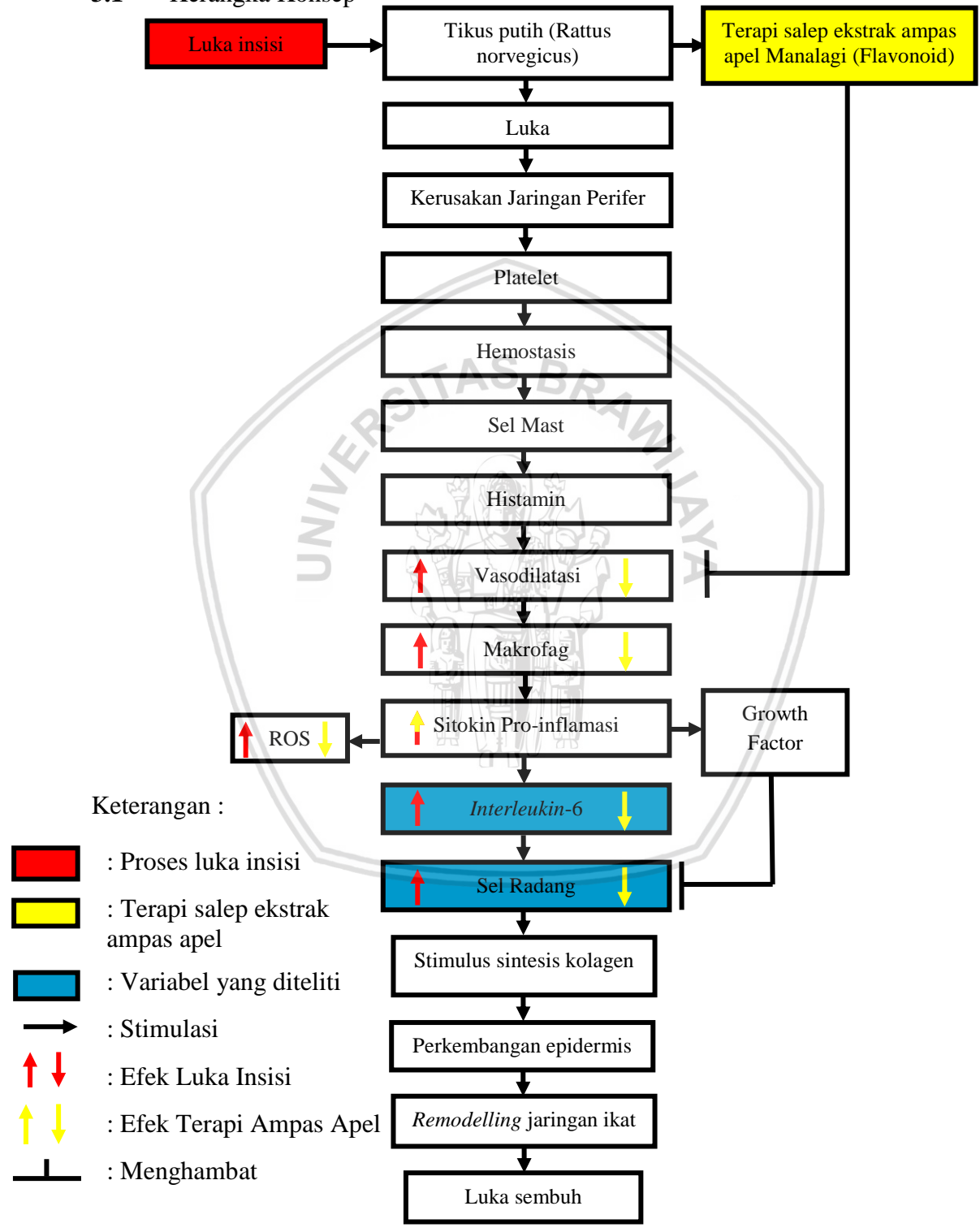


**Gambar 2.5** Tikus *Rattus norvegicus*

Tikus *Sparague Dwaley* dan Wistar dapat digunakan untuk aplikasi penelitian dalam aspek eksperimen pembedahan, studi umum, metabolisme dan nutrisi, neurologi, onkologi, farmakologi, fisiologi dan penuaan, teratologi, serta toksikologi (Nur, 2017). Kulit tikus dilengkapi dengan rambut yang tidak terlalu tebal sehingga cocok untuk penelitian pada kulit. Kulit dilengkapi dengan epidermis tipis dan sebagian besar ditutupi oleh rambut (O'Malley, 2005). Rambut tikus yang tidak tebal memberikan keuntungan dalam penelitian, yaitu tidak mengganggu pemisahan epidermis dan dermis, memudahkan terapi bahan farmakologis secara topikal dalam berpenetrasi ke kulit selama penelitian berlangsung (Choi *et al.*, 2001).

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Rangkaian proses penyembuhan luka dimulai sesaat setelah proses luka terjadi. Luka yang di timbulkan dari hasil insisiakan menyebabkan kerusakan pada jaringan kulit. Fase hemostasis akan dimulai, berfungsi untuk menghentikan pendarahan dengan melibatkan tiga langkah utama yaitu spasme vaskular, pembentukan sumbat trombosit, dan koagulasi darah. Setelah proses hemostasis, maka proses yang selanjutnya terjadi adalah proses inflamasi. Setelah terjadinya kerusakan jaringan dan adanya invasi dari bakteri, ateriol pada daerah yang rusak akan melebar untuk meningkatkan aliran darah ke lokasi kerusakan. Vasodilatasi ini disebabkan oleh histamin yang dilepaskan oleh sel mast. Pelepasan histamin juga meningkatkan permeabilitas kapiler dengan memperbesar pori kapiler. Pada fase inflamasi ini terjadi aktivasi berbagai sel inflamasi yang salah satunya adalah makrofag. Selain melalui proses fagositosis, makrofag juga berperan dalam eliminasi bakteri dengan cara memproduksi *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS penting dalam mencegah infeksi bakterial, namun tingginya kadar ROS secara berkepanjangan akan mengaktivasi dan mempertahankan kaskade asam arakhidonat yang akan memicu ulang timbulnya berbagai mediator inflamasi. Selain sebagai fagositosis, makrofag juga memproduksi *Growth Factor* yang berfungsi untuk memicu terjadinya proses angiogenesis dan pembentukan fibroblas. Makrofag juga memproduksi sitokin pro inflamasi seperti IL-6.

Luka selanjutnya akan memasuki fase inflamasi akut, yang berfungsi untuk menyingkirkan jaringan mati dan melawan infeksi oleh bakteri patogen. Sel yang mengalami kerusakan akan mengeluarkan sitokin yang berfungsi sebagai faktor kemotaktik sel radang sebagai respon inflamasi. Faktor kemotaktik akan

menyebabkan sel radang seperti sel leukosit polimorfonuklear, makrofag, dan limfosit bergerak menuju luka. Sel radang akan melakukan pertahanan terhadap agen infeksius seperti bakteri yang mengontaminasi luka. Sel radang akan menghasilkan *growth factor*, MMP, sitokin, dan radikal bebas. Apabila proses inflamasi berlangsung berkepanjangan menimbulkan inflamasi kronis yang merusak jaringan sehingga luka sembuh lebih lama.

Kombinasi pemberian terapi salep ekstrak ampas apel akan menghambat proses terjadinya inflamasi. Terhambatnya proses inflamasi akan mengurangi terjadinya vasodilatasi pembuluh darah dan aliran darah akan berkurang. Apabila respon inflamasi selesai, maka ekspresi IL-6 dan jumlah sel radang akan menurun. Selanjutnya luka akan mengalami proses proliferasi. Pada fase ini, sel-sel keratinosit mengalami proliferasi yang mempercepat epitelisasi. Selain itu, fibroblast juga akan berproliferasi dan membentuk granulasi. Tahap terakhir dari proses penyembuhan luka adalah fase *remodelling*. Pada fase ini fibroblas berproliferasi membentuk matriks ekstraseluler yang mengandung myofilamen dan disebut myofibroblast. Matriks ini akan bermigrasi ke area luka dan berkontraksi untuk mengurangi ukuran luka sehingga daerah luka akan tertutup.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

1. Terapi salep ampas apel (*Malus sylvestris* Mill) dapat menurunkan ekspresi interleukin-6 (IL-6) pada luka sayat hewan coba *Rattus norvegicus*.
2. Terapi salep ampas apel (*Malus sylvestris* Mill) dapat menurunkan jumlah sel radang pada luka sayat hewan coba *Rattus norvegicus*.





## BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli - Agustus 2017. Pemrosesan ampas apel dilakukan di Laboratorium Materia Medica, Batu. Pembuatan salep ampas apel dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya. Pemeliharaan hewan coba dan perlakuan pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Epidemiologi, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya. Pembuatan preparat *Hematoxylin Eosin* (HE) dilakukan di Laboratorium Kesima. Pengujian imunohistokimia ekspresi IL-6 dilakukan di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

### 4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang dan botol minum tikus, timbangan, seperangkat alat bedah, mikroskop cahaya, *autoclave*, oven, lemari pendingin, inkubator, *waterbath*, cawan petri, gelas ukur, wadah kaca tertutup, *object glass*, penyaring karet, *disposable syringe*, plastik klip, mikrotom, mortar dan alu, *spatula*, *software ImageRaster*, *software Immunoratio*, *Software SPSS 22 for Windows*, wadah kaca tertutup dan toples (semua alat yang digunakan dalam pembuatan salep), dan pot organ.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar dengan umur 8-12 minggu dan berat badan 150-250 gram, pakan dan air minum, ampas Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill), formula salep (vaselin album dan cera alba), NaCl fisiologis 0,9%, *ketamil injection*, xylazine, alkohol (70%, 80%, 90%, 100%), pewarnaan hematoksilin eosin, *Netral Buffer Formalin* (NBF) 10%, *aquadest*, larutan PBS pH 7,4, *Strep Avidin Horse Radish Peroxidasae* (SA-HRP), *Bovine Serum Albumin* (BSA), *Diamino benzidine* (DAB), parafin, eter 70%, xylol, antibodi IL-6 berlabel *Santa cruz Biotechnology Inc*, dan antibodi sekunder biotin (*goat anti rabbit*).



### 4.3 Sampel Penelitian

Hewan model menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, *strain Wistar*, berumur 8-12 minggu, sehat dengan berat badan sekitar 150-250 gram, pakan dan air minum yang disediakan *ad libitum*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang disediakan berjumlah 20 ekor. Hewan coba diadaptasikan selama 7 hari untuk menyesuaikan dengan dengan kondisi di laboratorium.Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

$t (n-1) \geq 15$	Keterangan :
$5 (n-1) \geq 15$	t : Jumlah perlakuan
$5n - 5 \geq 15$	n : Jumlah ulangan yang diperlukan
$5n \geq 20$	
$n \geq 4$	

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Penggunaan hewan coba dalam penelitian telah mendapatkan persetujuan dari komisi etik.

### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana dengan subyek dibagi menjadi 5 kelompok secara acak. Tiap kelompok terdiri dari 4 tikus (**Tabel 4.1**)

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Perlakuan
1 (Kontrol Negatif)	Tanpa Perlakuan
2 (Kontrol Positif)	Luka insisi + Penggantian kassa steril
3 (Perlakuan 1)	Luka insisi+ Salep ampas Apel Manalagi ( <i>Malus sylvetris</i> Mill) 25% + Penggantian kassa steril
4 (Perlakuan 2)	Luka insisi + Salep ampas Apel Manalagi ( <i>Malus sylvetris</i> Mill) 35% + Penggantian kassa steril
5 (Perlakuan 3)	Luka insisi + Salep ampas Apel Manalagi ( <i>Malus sylvetris</i> Mill) 45% + Penggantian kassa steril

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : Dosis terapi salep ampas apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill)
- Variabel terikat : Jumlah sel radang dan ekspresi IL-6
- Variabel kontrol : Tikus putih (*Rattus norvegicus*), jenis kelamin, umur, berat badan, suhu, kandang, pakan dan air minum, perlakuan luka insisi, penggantian kassa steril pada luka.

4.6 Tahapan Penelitian

- 1) Persiapan hewan coba.
- 2) Persiapan dan pengambilan ampas apel
- 3) Pembuatan salep ampas apel
- 4) Perlakuan luka insisi pada hewan coba.
- 5) Terapi salep ampas apel
- 6) Pengambilan dan pembuatan preparat kulit.
- 7) Tahap pengamatan pertambahan gambaran sel radang.
- 8) Tahap pengamatan ekspresi IL-6.
- 9) Analisis data.

## 4.7 Prosedur Kerja

### 4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Pada percobaan ini terdapat 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan dengan berat badan 150-250 gram. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diadaptasi selama 7 hari dengan pemberian pakan standar berupa campuran pelet dan jagung kering pada semua tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibagi dalam 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dipelihara dalam kandang bak plastik yang dilengkapi dengan penutup kawat dikandangkan dengan pakan dan minum ad libitum. Lokasi kandang dan tempat pemeliharaan bebas dari polusi kendaraan dan industri. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dipelihara di Laboratorium Epidemiologi, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya.

### 4.7.2 Pembuatan Ekstrak Ampas Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill)

Ampas Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) yang digunakan adalah ampas basah dari sisa produksi pabrik minuman sari Apel “Dewata” yang ada di Kota Batu, Jawa Timur. Ampas yang digunakan langsung diambil setelah dikeluarkan agar meminimalisir kontaminasi bakteri. Pembuatan ekstrak ampas apel dilakukan di Laboratorium Fitokimia UPT Materia Medika Batu. Proses pembuatan yang dilakukan yaitu dilakukan preparasi meliputi tahap penyiapan bahan baku dan ekstraksi. Ampas yang baru diambil dari pabrik dikeringkan pada ruangan terbuka yang terpapar oleh sinar matahari selama 48 jam agar tidak merusak flavonoid maupun vitamin C yang terkandung didalam ampas Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) (Hernani, 2009). Ampas apel yang telah dikeringkan tersebut dihaluskan. Serbuk ampas apel ditimbang sebanyak 400 gram, dan dilanjutkan dengan melakukan pembasahan dengan pelarut etanol 70% sebanyak 400 mL. Serbuk yang telah dibasahi dimasukkan dengan pelarut ke dalam toples, diratakan, dan

ditambahkan pelarut etanol 70% sampai terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat atau lebih). Pelarut yang ditambahkan sebanyak 2 L, ditutup toples dengan rapat selama 24 jam dan dishaker dengan kecepatan 50 rpm. Ekstrak cair kemudian disaring dan ditampung kedalam erlenmeyer. Hasil ekstrak cair diuapkan menggunakan *rotary evaporator* selama 4 jam untuk evaporasi. Ekstrak yang dihasilkan, diuapkan di atas water bath selama 2 jam. Metode ekstraksi ampas apel pada **lampiran 2**.

#### 4.7.3 Salep Ampas Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill)

Salep dibuat dengan bahan dasar *vaselin album* dan PGA. Menurut Naibaho dkk.,(2013) salep dengan bahan dasar hidrokarbon memiliki waktu kontak dan daya absorpsi yang tinggi dibandingkan dengan basis salep lain. Pembuatan salep ekstrak ampas apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) menggunakan formulasi salep Vaseline Albumin : Ekstrak : *Pulvic Gummi Arabicum* (PGA) sebesar 4 : 2 : 1. Emulsi dibuat dengan menggunakan metode gom kering/continental. Jumlah perbandingan 4 bagian minyak, 2 bagian air, dan 1 bagian emulgator (Dirjen POM, 1995). Prosedur pembuatannya yaitu menimbang PGA, vaselin album, serta ekstrak ampas apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill). PGA beserta ekstrak ampas apel dicampurkan ke dalam mortar, diaduk dengan alu hingga merata, kemudian ditambahkan vaselin album, aduk hingga menjadi salep. Perhitungan dosis pemberian salep ekstrak ampas apel manalagi terdapat pada **lampiran 3**.

#### 4.7.4 Perlakuan Luka Insisi pada Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberi tanda atau label pada bagian ekor dengan menggunakan spidol tahan air sesuai kelompok. Rambut tikus putih (*Rattus norvegicus*) sekitar sayatan dicukur sampai licin seluas 4 cm x 4 cm, kemudian dibersihkan dengan kapas beralkohol 70% dan dilakukan anestesi dengan menggunakan ketamin (10 mg/kg BB) *intra-muscular* (Mahandaru dan Ishandono,

2012). Pembuatan luka insisi pada daerah *median dorsal vertebrae* dengan panjang 3 cm dan kedalaman hanya sampai sub-kutan, sehingga tidak menembus muskulus dengan *scalpel* di daerah tengah punggung tikus. Insisi dilakukan dengan menarik *scalpel* ke arah *caudal* secara perlahan (Sudrajat, 2006).

Selama penelitian tikus diperlakukan sebaik mungkin, tikus diusahakan tidak lapar, tidak haus, bebas stress, dan leluasa bergerak. Pemberian pakan dan air minum dilakukan setiap hari *ad libitum*. Kandang ditempatkan di ruangan yang tenang, tidak bising, diatur suhu, kelembaban, dan cukup cahaya. Kebersihan kandang dijaga setiap hari dan sekam diganti setiap 1 hari sekali.

#### 4.7.5 Pemberian Terapi Salep Ampas Apel

Pemberian terapi dilakukan dua kali sehari secara topikal setiap 9 jam dengan cara mengoleskan salep ampas Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) di area luka insisi selama 10 hari, dimulai pada hari ke-8 pasca insisi. Pemberian salep ampas Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) pada area yang dilakukan luka insisi dengan konsentrasi bertingkat, yaitu 25% pada kelompok tikus perlakuan 1 (P1), 35% pada kelompok tikus perlakuan 2 (P2), dan 45% pada kelompok tikus perlakuan 3 (P3) kemudian dilanjutkan dengan pembalutan luka dengan menggunakan kassa steril yang ditutup menggunakan plester sehari sekali selama 10 hari pasca insisi. Salep diberikan dengan menimbang sebanyak 1 gram dua kali sehari (Nasution, 2015) selama 10 hari sehingga membutuhkan 20 gram sediaan salep.

#### 4.7.6 Pengambilan dan Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit

Pengambilan jaringan kulit tikus putih dilakukan hari ke-15. Langkah awal yang dilakukan, yaitu euthanasi dengan cara dislokasi *os.vertebrae cervicale*. Pengambilan sampel organ kulit dilakukan pada bagian sub-kutan. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diletakan dengan posisi *dorso ventral* pada papan penyayatan dan bagian kulit tempat insisi diisolasi dan dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9%. Kulit dipotong menjadi dua bagian untuk dilakukan pengambilan jaringan, secara

aseptik menggunakan gunting dengan cara mengeksisi pada bagian luka yang paling luas, dengan mengikut sertakan jaringan kulit normal kira-kira 1 cm dari tepi luka. Jaringan yang diperoleh kemudian dimasukkan kedalam larutan pengawet NBF 10%, diproses untuk dilakukan pembuatan preparat histopatologi kulit (Irma, 2012).

Pembuatan preparat dilakukan dengan fiksasi jaringan kulit menggunakan formalin 10%, kemudian dilakukan *trimming* organ dan dimasukkan dalam *cassette tissue* dari plastik, setelah itu dilakukan proses dehidrasi alkohol menggunakan konsentrasi alkohol bertingkat, yaitu 70%, 80%, dan 90%, alkohol absolut I, alkohol absolut II, kemudian dilakukan penjernihan menggunakan *xylol* I dan *xylol* II. Proses pencetakan menggunakan parafin I, parafin II, dan parafin III. Sediaan dimasukkan kedalam alat pencetak yang berisi parafin setengah volume dan sediaan diletakkan ke arah vertikal dan horizontal, sehingga potongan melintang melekat pada dasar parafin. Setelah mulai membeku, parafin ditambahkan kembali hingga alat pencetak penuh dan dibiarkan sampai parafin mengeras. Blok-blok parafin kemudian dipotong tipis setebal 5  $\mu$ m dengan menggunakan mikrotom. Hasil potongan yang berbentuk pita (*ribbon*) tersebut dibentangkan diatas air hangat bersuhu 46°C dan langsung diangkat untuk meregangkan potongan, agar tidak berlipat atau menghilangkan lipatan akibat dari pemotongan. Sediaan tersebut diletakkan di atas *object glass* dan dikeringkan semalaman dalam inkubator bersuhu 60°C (Balqis, dkk., 2014).

#### **4.7.7 Metode Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) Sel Radang**

Pewarnaan HE menggunakan zat pewarna *hematoxylin*. Zat pewarna *hematoxylin* berfungsi untuk memberi warna biru pada inti sel (basofilik). *Eosin* merupakan *counterstaining hematoxylin*, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda. Tahapan pewarnaan HE diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan *xylol* lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II, dan III masing-



masing 5 menit, alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing 5 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir 15 menit dan dilanjutkan dengan *aquadest* 5 menit, setelah itu, diwarnai dengan *hematoxylin* 10 menit, kemudian dicuci air mengalir 30 menit dilanjutkan dengan *aquadest* 5 menit. Sediaan diwarnai dengan *Eosin* 5 menit dan dibilas menggunakan air 30 menit dilanjutkan dengan *aquadest* 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 5 menit, setelah itu dilakukan proses *clearing* dengan *xylol* I, II, dan III selama 3 menit. Terakhir, dilakukan *mounting* (perekatan) menggunakan entellan serta ditutup menggunakan *cover glass* (Talley, *et al.*, 2011). Perhitungan jumlah sel radang dinilai dengan menghitung jumlah pada seluruh lapang pandang menggunakan mikroskop cahaya *olympus* seri BX51. Hasil foto dari mikroskop kemudian diproses menggunakan *software ImageRaster®* perbesaran 400x. Jumlah sel radang pada seluruh lapang pandang dibandingkan dengan kelompok kontrol dan perlakuan (Kartikaningtyas dkk., 2015).

#### 4.7.8 Metode Imunohistokimia (IHK) Ekspresi IL-6

Metode pewarnaan IHK diawali dengan perendaman preparat pada *xylol* 1, *xylol* 2, dan etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 100%). Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 1x15 menit selanjutnya ditetesi dengan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan 1% BSA 30 menit pada suhu ruang, preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 5 menit sebanyak 3 kali, dan diinkubasi dengan antibodi primer *rabbit anti-rat* IL-6 (pengenceran 1: 150) selama 2 jam dengan suhu ruang dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder *goat anti rabbit* IL-6 selama 1 jam dengan suhu ruang, dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.



*Slide* preparat ditetesi dengan SA-HRP selama 40 menit, kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali kemudian ditetesi dengan DAB selama 10 menit. Mencuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Setelah itu *counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit setelah itu cuci dengan air mengalir. Bilas dengan *aquadest* dan keringkan. *Slide* preparat di *mounting* dengan entellan dan ditutup dengan *cover glass*.

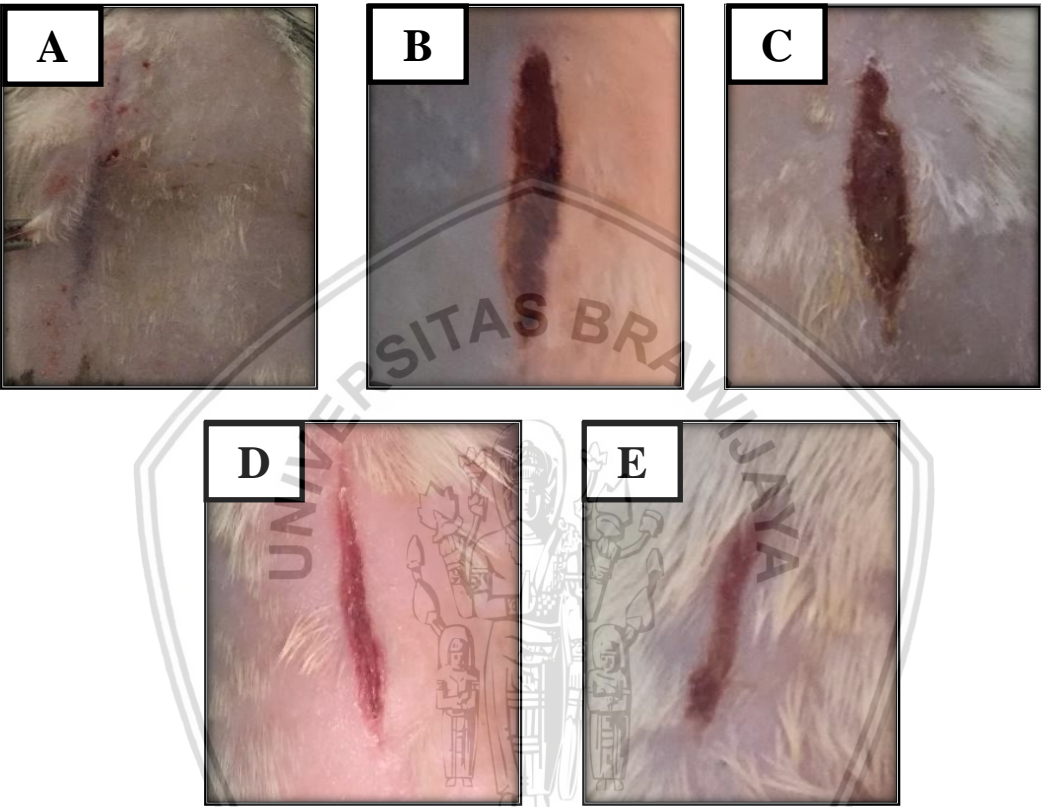
Pengamatan ekspresi IL-6 dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400x dengan lima bidang pandang dan hasil pengamatan difoto. Hasil foto dari mikroskop kemudian diproses menggunakan *software Immunoratio®* untuk mengamati penurunan ekspresi IL-6 yang ditandai dengan peningkatan persentasi luas daerah yang terwarnai.

#### **4.7.9 Analisa Data**

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisis kuantitatif. Data dianalisis dengan *OneWay ANOVA* menggunakan *software SPSS (Statistical Package for Social Science)*. Apabila antar kelompok perlakuan diperoleh hasil yang berbeda nyata maka dilanjutkan uji *tukey*  $\alpha = 0,05$  untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan (Kusriningrum, 2008).

## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

Luka didefinisikan sebagai keadaan hilang atau rusaknya sebagian dari jaringan tubuh. Gambaran makroskopis luka insisi pada daerah median dorsal tikus putih *Rattus norvegicus* sepanjang 3 cm yang diberikan terapi salep ekstrak ampas apel selama 10 hari.



**Gambar 5.1** Gambaran makroskopis kulit pasca luka insisi hari ke-10

Keterangan : (A) kelompok kontrol negatif (K-), (B) kelompok kontrol positif (K+), (C) kelompok terapi salep ekstrak ampas apel 25% (P1), (D) kelompok terapi salep ekstrak ampas apel 35% (P2), (E) kelompok terapi salep ekstrak ampas apel 45% (P3).

Gambaran makroskopis jaringan kulit kontrol negatif yang tidak diberikan perlakuan menunjukkan kulit dalam keadaan normal atau sehat (**Gambar 5.1.A**). Berbeda dengan tikus kontrol positif yang diberi perlakuan luka insisi tanpa terapi salep ekstrak ampas apel pada hari ke 10 setelah di euthanasi menunjukkan luka masih terbuka, bengkak pada tepi luka, terlihat rubor, dan area luka masih sedikit basah (**Gambar 5.1.B**). munculnya warna merah pada permukaan luka merupakan tanda kesembuhan yang baik karena proses angiogenesis berjalan sempurna dan

tidak adanya infeksi dari mikroorganisme. Kelompok P1 yang diberi perlakuan luka insisi dengan terapi salep ekstrak ampas apel 25% menunjukkan mulai terjadi penutupan luka, rubor memudar, tampak lapisan jernih pada area luka dan masih terdapat sisa debris (**Gambar 5.1.C**). Hal ini sesuai dengan pendapat Dewi dkk., (2013) bahwa pada fase inflamatori terjadi peningkatan aliran darah ke daerah luka yg menyebabkan rubor, terjadi juga aliran fibrin untuk melindungi adanya infeksi bakteri, pengerahan sel darah putih, monosit, dan makrofag yang berfungsi untuk fagositosis dan memakan sisa sel mati.

Kelompok P2 yang diberi perlakuan luka insisi dengan terapi salep ekstrak ampas apel 35% menunjukkan luka mulai mengering, terjadi penutupan luka yang belum sempurna, dan debris sudah menghilang (**Gambar 5.1.D**). Fase ini memasuki fase proliferasi dimana fibroblas membentuk kolagen dan jaringan ikat. Di sini juga terjadi pembentukan kapiler baru yang dimulai saat terjadi peradangan (Harvey, 2005; Schultz, dkk., 2005 dalam Dewi dkk., 2013) Kelompok P3 luka insisi dengan terapi salep ekstrak ampas apel menunjukkan luka menutup tetapi belum sempurna, dan jaringan di sekitar luka mulai ditumbuhi rambut (**Gambar 5.1.E**). Proses ini menandakan terjadinya kesembuhan yang dimulai dari adanya pertumbuhan kapiler dan pertumbuhan jaringan granula yang dimulai dari dasar luka. Proses granulasi berjalan seiring dengan proses reepitelisasi. Sampai pada tahap akhir proses ini akan terjadi proses epitelisasi pada permukaan luka (Dewi dkk., 2013)

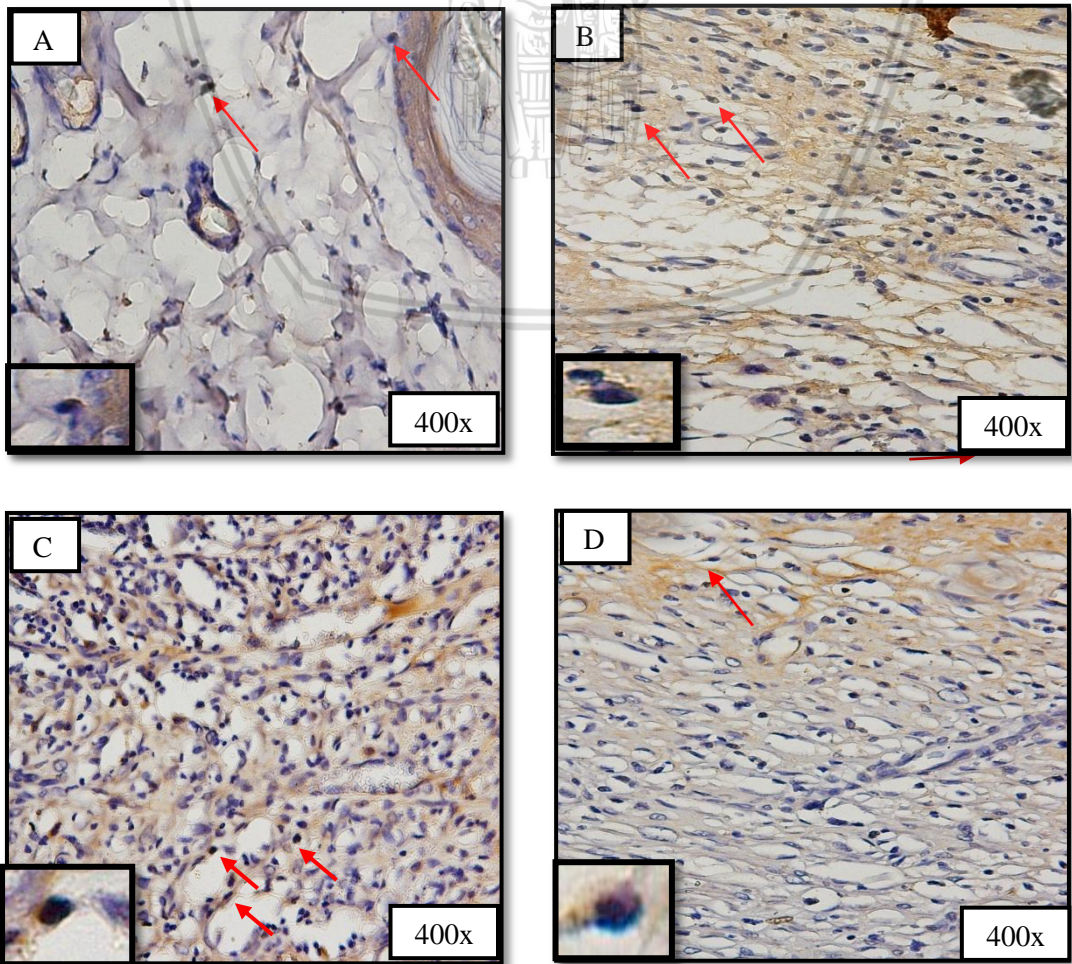
## **5.1 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Ampas Apel (*Malus sylvestris* Mill)**

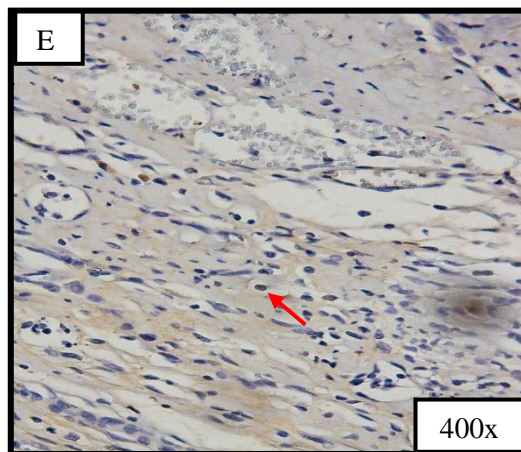
### **Terhadap Ekspresi *Interleukin-6* (IL-6) Pada Kulit Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Luka Insisi**

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian salep ekstrak ampas apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill) terhadap ekspresi IL-6 pada kulit tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi. Pengukuran ekspresi IL-6 diamati berdasarkan reaksi antigen dan antibodi menggunakan metode imunohistokimia.




Imunohistokimia merupakan suatu metode pewarnaan substansi atau bahan aktif di dalam jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti bahan aktif (antibodi) (Bintari, 2016). Ekspresi IL-6 merupakan hasil interaksi antara IL-6 pada jaringan dengan antibodi yang ditambahkan antibodi primer *rabbit anti rat IL-6* dan antibodi sekunder, sehingga terbentuk ikatan kompleks antigen-antibodi yang dikenali SA-HRP yang akan terwarnai dengan substrat kromagen DAB sehingga tervisualisasi warna kecokelatan pada preparat. Preparat yang terwarnai coklat akan dihitung persentase (%) area ekspresi menggunakan program *Imunoratio*. Ekspresi IL-6 pada masing masing kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang ditandai dengan perbedaan persentase warna coklat pada area ekspresi yang terbentuk. Hasil penelitian mengenai pengaruh salep ekstrak ampas apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill) terhadap ekspresi *Interleukin-6* (IL-6) pada kulit tikus pasca insisi dapat dilihat pada **Gambar 5.2**





**Gambar 5.2** Ekspresi *Interleukin-6* (IL-6) pada kulit tikus (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi pada sitoplasma sel radang (Imunohistokimia: perbesaran 400x)

Keterangan : (A) Kelompok kontrol negatif, (B) Kelompok kontrol positif, (C) Kelompok terapi salep ekstrak ampas apel manalagi 25%, (D) Kelompok terapi salep ekstrak ampas apel manalagi 35%, (E) Kelompok terapi salep ampas apel manalagi 45%. Tanda panah merah (  ) menunjukkan ekspresi IL-6 dengan warna coklat pada sitoplasma sel radang.

Gambaran preparat histopatologi pewarnaan imunohistokimia (IHK) IL-6 dari kelima kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan persentase warna coklat pada area luka insisi (**Gambar 5.2**). Pada kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan), IL-6 muncul dalam jumlah yang lebih sedikit yaitu pada daerah dermis (**Gambar 5.2.A**) Hal ini berbeda dengan kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2.B**) maupun kelompok yang diberi perlakuan (**Gambar 5.2. C, D, dan E**) yang lebih banyak terwarnai kecokelatan. Hal ini disebabkan karena pada kelompok kontrol negatif dalam keadaan normal (tidak mengalami kerusakan jaringan) sehingga ekspresi IL-6 rendah. Pada kelompok positif dan kelompok perlakuan yang dibuat luka insisi menyebabkan kerusakan jaringan kulit sehingga mempengaruhi reaksi imun dan memberikan respon inflamasi, kemudian mengaktifkan sitokin pro inflamasi *Interleukin-6* (IL-6) pada area luka tersebut dalam mendukung proses penyembuhan luka. Semakin banyaknya ekspresi IL-6 menandakan jika proses inflamasi sedang berlangsung, dan menurunnya ekspresi IL-6 menandakan proses

inflamasi akan berakhir dan masuk ke fase proliferasi untuk mendukung proses reepitelisasi.



**Tabel 5.1** Persentase area ekspresi IL-6 kulit pada berbagai perlakuan

Kelompok	Rata rata Ekspresi IL-6 (%) ± SD
K- (Negatif)	27,90±2,18 <sup>a</sup>
K+ (Positif)	43,85±3,35 <sup>c</sup>
P1 (Salep ekstrak ampas apel 25%)	38,45±3,27 <sup>c</sup>
P2 (Salep ekstrak ampas apel 35%)	35,30±1,48 <sup>b</sup>
P3 (Salep ekstrak ampas apel 45%)	25,34±1,54 <sup>a</sup>

Keterangan: SD: Standar Deviasi; Perbedaan notasi a, b, dan c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p<0,05$ ) antara kelompok perlakuan. K (-) Kontrol negatif, (K+) Kontrol positif, (P1) Terapi salep ekstrak ampas apel manalagi 25%, (P2) Terapi salep ekstrak ampas apel manalagi 35%, (P3) Terapi salep ekstrak ampas apel manalagi 45%.

Persentase area ekspresi IL-6 diukur menggunakan *software Immunoratio* dan diperoleh jumlah rata rata ekspresi IL-6 pada **tabel 5.1** kemudian diuji statistik menggunakan *oneway ANOVA* dan dilanjutkan uji lanjutan *Tukey* dengan  $\alpha=0,05$ . Hasil uji statistik terdapat pada **Lampiran 10**. Analisis uji *one way ANOVA* menunjukkan bahwa pemberian salep ekstrak ampas apel manalagi mampu menurunkan rata rata ekspresi *Interleukin-6* (IL-6) secara signifikan ( $p<0,05$ ). Pada kelompok negatif ekspresi IL-6 menunjukkan rata rata 27,90±2,18% (**Tabel 5.1**). Kelompok kontrol negatif digunakan sebagai indikator normal pada ekspresi IL-6, dan sebagai pembanding dengan kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan terapi pemberian salep ekstrak ampas apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*).

IL-6 akan tetap terekspresi dalam jumlah yang rendah meskipun tidak terjadi respon imunologis, dikarenakan sitokin berperan dalam aktifitas diferensiasi, proliferasi, dan kelangsungan sel imun termasuk regulasi produksi aktifitas sitokin lain (Tahir, 2013). Sitokin juga berperan untuk maturasi dan program kematian sel (apoptosis) (Djamal dan Winiati, 1999).

Ekspresi IL-6 tikus kelompok kontrol positif (K+) memiliki rata rata ekspresi 43,85±3,35%, hal ini menunjukkan nilai persentase rata rata tertinggi bila dibandingkan dengan nilai persentase rata rata ekspresi IL-6 pada kelompok lain.



Tingginya nilai ekspresi IL-6 dikarenakan adanya respon inflamasi jaringan akibat luka insisi tanpa diberikan terapi. Menurut pendapat Velnar *et al.*, (2009), sitokin IL-6 memiliki fungsi sebagai aktivator makrofag dimana pada fase akhir inflamasi makrofag akan menghasilkan *growth factor* yang diperlukan pada fase proliferasi dalam penyembuhan luka.

Rata rata area ekspresi IL-6 pada kelompok perlakuan (P1, P2, P3) yang diberi terapi salep ekstrak ampas apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 25% (P1), 35% (P2), dan 45% (P3) menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $p<0,05$ ), namun pada kelompok tikus P1 pemberian salep ekstrak ampas apel manalagi konsentrasi 25% tidak berbeda nyata terhadap kontrol positif dengan rata rata ekspresi  $38,45\pm 3,27\%$  yang ditandai dengan tidak adanya perbedaan notasi antara K+ dan P1. Hal ini diduga karena kandungan flavonoid pada konsentrasi 25% kurang bekerja secara optimal dalam proses penyembuhan luka. Menurut Dipietro (2003), dalam waktu 2-3 hari populasi sel radang didominasi oleh monosit dan berdiferensiasi menjadi makrofag, dan bergabung dengan makrofag setempat untuk memulai proses penyembuhan luka. Makrofag merupakan sel utama dalam proses penyembuhan luka yang mendorong fase inflamasi memasuki fase proliferasi. IL-6 disekresikan oleh limfosit T dan makrofag sebagai respon terhadap infeksi dan trauma (Falanga, 2004).

Kelompok tikus P2 dengan terapi salep ekstrak ampas apel manalagi konsentrasi 35% mengalami penurunan ekspresi IL-6 terhadap kontrol positif dengan rata rata ekspresi  $35,30\pm 1,48\%$ . Ekspresi IL-6 mengalami penurunan dikarenakan ekstrak ampas apel manalagi memiliki efek antiinflamasi pada kandungan flavonoid. Apel mengandung senyawa flavonoid yang disebut kuersetin. Menurut Hidayat dkk., (2015), flavonoid memiliki aktivitas antiinflamasi yang bekerja menghambat fase penting dalam biosintesis yaitu pada lintasan siklooksigenase dan merangsang sel sel

seperti makrofag untuk menghasilkan *growth factor* dan sitokin sehingga mempercepat memasuki fase proliferasi dan penyembuhan luka.

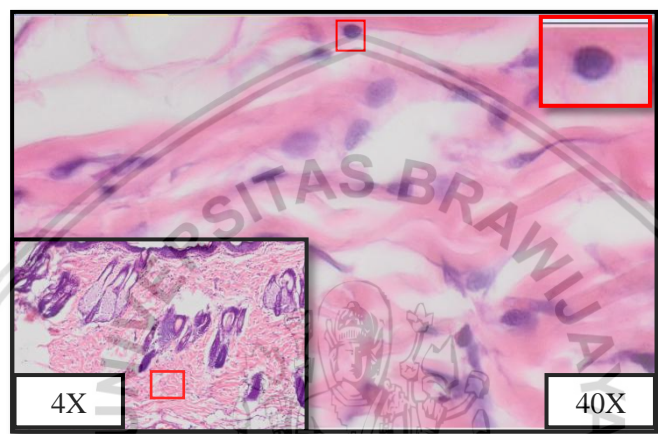
Ekspresi IL-6 kelompok tikus P3 dengan terapi salep ekstrak ampas apel manalagi konsentrasi 45% memiliki rata rata rata rata ekspresi sebesar  $25,34 \pm 1,54\%$  (**Tabel 5.1**) yang tidak berbeda nyata dengan kelompok K-. Pada kelompok P3 mengalami penurunan ekspresi IL-6 yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok K+, P1, dan P2. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemberian salep ekstrak ampas apel manalagi konsentrasi 45% pada luka insisi merupakan yang paling efektif jika dibandingkan dengan konsentrasi 35% dan 45% dalam menurunkan IL-6. Pada keadaan inflamasi berbagai mediator turunan endotel dan faktor komplemen menyebabkan adanya leukosit ke dinding endotel. Hal tersebut menyebabkan leukosit menjadi tidak bergerak bebas lagi dan menstimulasi degranulasi neutrofil neutrofil. Flavonoid dapat menghambat degranulasi neutrofil dan mengurangi pelepasan asam arakhidonat oleh neutrofil sehingga mengurangi inflamasi (Adi dkk., 2013). Berdasarkan hasil diatas, maka pemberian salep ekstrak ampas apel manalagi *Malus sylvestris Mill* yang terbaik dalam penurunan ekspresi IL-6 sebagai antiinflamasi yaitu salep dengan konsentrasi 45%.

## **5.2 Pengaruh Salep Estrak Ampas Apel Manalagi (*Malus sylvestris Mill*) Terhadap Jumlah Sel Radang Kulit Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Luka Insisi**

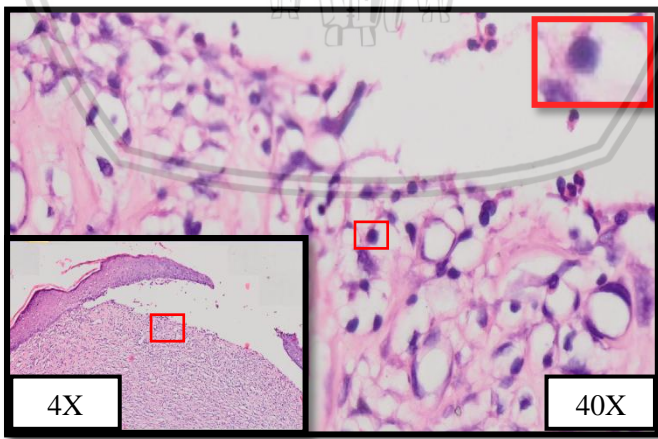
Penelitian ini dilakukan untuk melihat fase penyembuhan luka insisi pada jaringan kulit tikus putih yang ditandai dengan adanya sel radang mononuklear (MN) dan polimorfonuklear (PMN). Menurut Vykoukal *et al.*, (2009), Limfosit memiliki 1 inti besar dengan sitoplasma yang sedikit. Makrofag memiliki 1 inti besar dan marginasi tidak merata pada makrofag yang mature. Sel PMN merupakan leukosit granular yang memiliki nukleus dengan 3-5 lobus yang dihubungkan dengan benang kromatin dan sitoplasma yang mengandung granula yang sangat halus berwarna

ungu sedangkan stoplasma berwarna merah muda pada area sekitar jaringan kulit yang luka (Dorland, 1998).

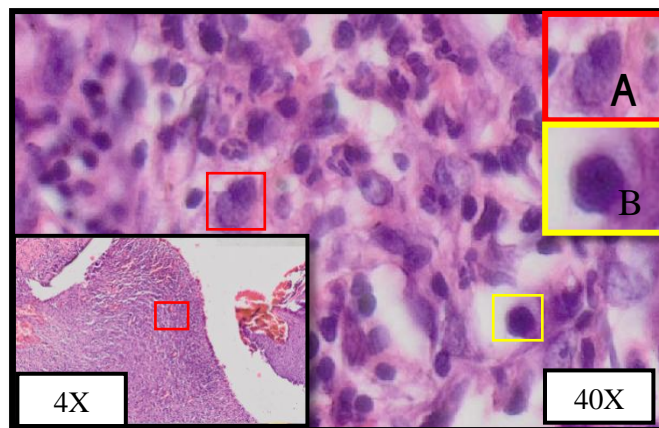
Pengamatan jumlah sel radang dapat dilakukan dengan melihat gambaran histopatologi menggunakan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE). Prinsip dari pewarnaan HE yaitu inti yang bersifat asam akan menarik zat atau larutan yang bersifat basa sehingga akan terwarnai biru. Sitoplasma bersifat basa akan menarik zat atau larutan yang bersifat asam sehingga berwarna merah (Brown, 2015).



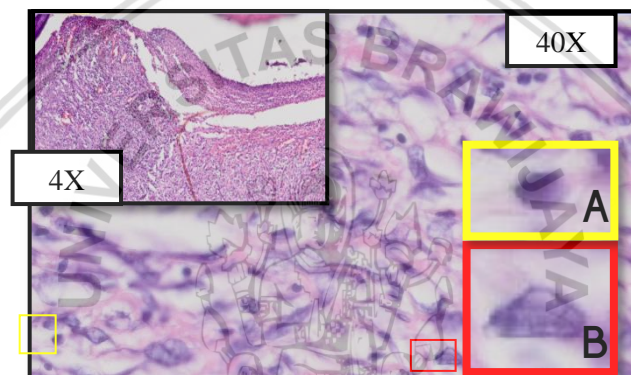
**Gambar 5.3** Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok negatif (tanpa perlakuan) perbesaran 40x lensa objektif. Terdapat sel radang mononuklear jenis monosit di bagian dermis kulit tikus.



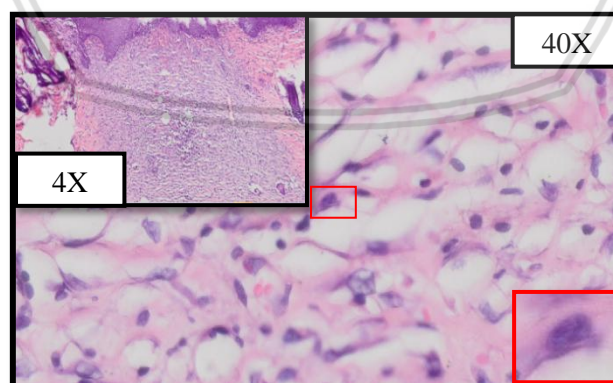
**Gambar 5.4** Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok positif dengan perbesaran 40x. Terdapat sel radang yang tinggi di bagian subkutan kulit berupa limfosit (A)



**Gambar 5.5** Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok terapi salep ekstrak ampas apel manalagi konsentrasi 25% dengan perbesaran 40x. Terdapat sel sel radang di daerah dermis luka insisi berupa makrofag (A) dan limfosit (B).



**Gambar 5.6** Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok terapi salep ekstrak ampas apel manalagi konsentrasi 35% dengan perbesaran 40x. Terdapat sel radang di daerah dermis luka insisi berupa monosit (A), dan makrofag (B).



**Gambar 5.7** Gambaran histopatologi jaringan kulit tikus putih dengan pewarnaan HE kelompok terapi salep ekstrak ampas apel manalagi konsentrasi 45% dengan perbesaran 40x. Terdapat sel radang di daerah dermis luka insisi berupa neutrofil.



Data kemudian dianalisis menggunakan *software* IBM SPSS *statistics* 22®. Berdasarkan uji statistik yang telah dilakukan menunjukkan hasil bahwa setiap perlakuan memiliki efek yang berbeda (**Tabel 5.2**)

**Tabel 5.2** Rata Rata Jumlah Sel Radang Pada Perbesaran Mikroskopis 400x

Kelompok	Rata rata Jumlah Sel Radang (%) ± SD
K- (Negatif)	8,50±0,25 <sup>a</sup>
K+ (Positif)	22,65±1,86 <sup>d</sup>
P1 (Salep ekstrak ampas apel 25%)	21,12±1,16 <sup>d</sup>
P2 (Salep ekstrak ampas apel 35%)	14,70±0,25 <sup>c</sup>
P3 (Salep ekstrak ampas apel 45%)	9,50±0,25 <sup>b</sup>

Keterangan : Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $\alpha<0,05$ ) antara kelompok perlakuan

Jumlah sel radang pada tikus kelompok kontrol negatif (tikus sehat) menunjukkan rata-rata 8,50±0,25 (**Tabel 5.2**). Rendahnya jumlah sel radang pada kelompok negatif (K-) disebabkan karena tidak terjadi kerusakan jaringan sehingga tidak menimbulkan adanya reaksi imunologis, hal ini sesuai dengan pendapat Djamal dan Winiati (1999), meskipun tidak terjadi respon imunologis sel radang akan tetap ada untuk melakukan fagositosis sel. Pada kelompok kontrol positif (K+) berbeda nyata ( $p<0,05$ ) dengan kelompok (K-), P2, P3, dan tidak berbeda nyata dengan kelompok terapi P1 yang menunjukkan rata-rata 22,65±1,86 (**Tabel 5.2**). Tingginya jumlah sel radang pada kelompok K(+) terjadi akibat adanya perlakuan luka insisi pada tikus putih yang menyebabkan kerusakan pada jaringan sehingga memperpanjang fase inflamasi pada luka. Meningkatnya makrofag dan neutrofil menuju tempat kerusakan jaringan meningkatkan daya fagositosis terhadap benda asing. Sel yang mengalami kerusakan akan mengeluarkan sitokin yang berfungsi sebagai faktor kemotaktik dari sel radang sebagai respon inflamasi. Faktor kemotaktik akan menyebabkan sel radang seperti sel makrofag, limfosit, dan leukosit polimorfonuklear bergerak menuju luka. Hal ini menyebabkan jumlah sel radang di area luka akan meningkat (Williams dan Moores, 2009).

Jumlah sel radang pada kelompok terapi P2 dengan terapi salep ekstrak ampas apel manalagi (35%) menunjukkan rata rata  $14,70 \pm 0,25$  dan P3 terapi salep ekstrak ampas apel manalagi (45%) menunjukkan rata rata  $9,50 \pm 0,25$ . Kelompok terapi P2 dan P3 berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok K+, dan P1. Berdasarkan hasil tersebut, perlakuan semua kelompok terapi mampu menurunkan jumlah sel radang pada luka insisi, tetapi perbedaan notasi yang terdapat pada tabel menunjukkan perbedaan penurunan jumlah sel radang. Pada terapi kelompok (P3) konsentrasi 45% menunjukkan konsentrasi yang optimal dalam kandungan flavonoid salep ekstrak ampas apel manalagi untuk menurunkan fase inflamasi dan telah memasuki fase proliferasi, dikarenakan rata rata jumlah sel radang hampir mendekati jumlah rata rata pada kontrol negatif. Menurut Adi dkk., (2013), mekanisme antiinflamasi pada flavonoid terjadi melalui efek penghambatan aktifitas enzim COX atau lipooksigenase, penghambatan akumulasi leukosit, penghambatan degranulasi neutrofil, dan juga penghambatan pelepas histamin. Flavonoid dapat menstabilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dengan cara bereaksi dengan senyawa reaktif dan radikal, sehingga radikal menjadi inaktif dan inflamasi dapat menurun.

Menurut penelitian Wulandari (2013), ekstrak apel manalagi konsentrasi 25% dapat menghambat terjadinya inflamasi akibat pertumbuhan bakteri *salmonella typhosa*. Kelompok (P2) konsentrasi 35%, rata rata jumlah sel radang yang lebih sedikit dibandingkan kelompok (P1). Selisih kadar flavonoid antara 25%-35% yang menyebabkan perbedaan jumlah rata rata sel radang. Pemberian terapi kelompok (P3) konsentrasi 45% didapatkan jumlah yang berbeda nyata dengan kelompok terapi negatif. Hal tersebut disebabkan oleh kadar flavonoid yang semakin besar. Bertambahnya kadar flavonoid mampu memberikan perbedaan yang nyata. Pada hasil penelitian ini didapatkan bahwa bertambahnya konsentrasi ekstrak ampas apel manalagi yang diberikan, maka jumlah zat aktif seperti flavonoid yang terkandung di

dalam ekstrak tersebut juga semakin tinggi, sehingga kemampuannya dalam menghambat inflamasi juga semakin besar.





## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan terkait dengan variabel yang diamati, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Pemberian salep ekstrak ampas apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dapat menurunkan ekspresi *Interleukin-6* (IL-6) pada jaringan kulit tikus (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi dengan konsentrasi efektif yaitu 45%
2. Pemberian salep ekstrak ampas apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dapat menurunkan jumlah sel radang pada jaringan kulit tikus (*Rattus norvegicus*) pasca luka insisi dengan konsentrasi efektif yaitu 45%

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek pemberian salep ekstrak ampas apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) terhadap *pet animal* dan hewan lain nya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A.H. Lichman, S. Pillai. 2007. *Cellular And Mollecular Immunology*. International Edition, 6<sup>th</sup> Edition. Saunders Elsevier, USA. 19-39, 262.
- Adi, P., Fidya, N. F. Sandi. 2013. Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Terhadap Jumlah IL-6 Pada Gingiva Tikus Yang Diinduksi *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang
- Adisti, W., 2014. *Daya Anti Bakteri Ekstrak Buah Apel Manalagi Terhadap Bakteri Salmonella Thyposa*. Adisti Apel Pustaka Vol.2 No.1 Pustaka BLM : Malang.
- Alfauziah, T.Q., dan A. Budiman. 2016. Uji Aktivitas Antifungi Emulsi Minyak Atsiri Bunga Cengkeh Terhadap Jamur Kayu. *Farmaka* 14(1) : 1-9
- Ariani, S., L. Loho., dan M.F. Durry. 2013. Khasiat Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Terhadap Pembentukan Jaringan Granulasi dan Reepitelisasi Penyembuhan Luka Terbuka Kulit Kelinci. *Jurnal e-Biomedik (eBM)* 1(2): 914-919
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web Online.at: [//animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus\\_norvegicus/](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_norvegicus/). [Diakses pada 10 Maret 2017].
- Arun, M., S. Satish, and P. Anima. 2013. Herbal Boons for Wounds. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5 (2) : 1-12
- Balqis, U., Rusmaidar, dan Marwiyah. 2014. Gambaran Histopatologi Penyembuhan Luka Bakar Menggunakan Daun Kedondong (*Spondias dulcis F.*) dan Minyak Kelapa pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Medika Veterinaria*, 8(1), 31-36
- Beanes, D., and S. Cockbill. 2003. The healing process. *Hospital Pharmacist* 9 : 255-260
- Bhowmik, D., K.P.S. Kumar, A. Yadav, S. Srivastara, S. Paswan, and A.S. Duttta. 2012. Recent Trends in Indian Traditional Herbs Syzygium Aromaticum and Its Health Benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(1) : 13-23
- Bintaro, I. G. 2016. Deteksi Aeromonas Hydrophilia Pada Ginjal Mencit (*Mus musculus*) Dengan Teknik Imunohistokimia [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya
- Brown, S. 2015. The Science and Application of Hematoxylin and Eosin Staining. Robert H. Lurie Comprehensive Cancer Center. Northwern University
- Candra, F.T.K. dan I. Budiman. 2017. Efek Pemberian Minyak Zaitun (*Olea europa*) Terhadap Penyembuhan Luka insisi Jantan Galur Swiss Webster.

- Choi, S.W., B.W. Son, Y.S. Son, Y.I. Park, S.K.Lee, dan M.H. Chung. 2001. The Wound Healing Effect Of A Glycoprotein Fraction Isolated From Aloe Vera. *British Journal of Dermatology* 145 (4) : 535-545
- David. 2007. *Anatomi Fisiologi Kulit dan Penyembuhan Luka*. Surabaya : Plastic Surgery Department University School Of Medicine Dr. Soetomo General Hospital
- Dewi, D. I. 2010. Tikus Riul (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769). *BALABA* 6 (2) : 22-23
- Dirjen POM. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi ke IV*. Jakarta: Departemen. Kesehatan Republik Indonesia.
- Djamal, N.Z., dan E. Winiarti. 1999. Peran Sitokin Dalam Patogenesis Berbagai Kelainan Mukosa Mulut. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya*. 6(2) : 31-42
- Gurtner, G.C. 2007. *Wound Healing Normal And Abnormal*. In: Thorne CH, Beasley, R.W., Aston, S.J., Bartlett, S.P., Gurtner, G.C., Spear, S.L. (Eds). *Grabb and Smith's plastic surgery*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; p:15-22.
- Guyton, A.C. and J.E. Hall. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. 11<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pa, USA: Elsevier Saunders.
- Hapsari, M. D. Y. dan T. Estiasih. 2015. Processing and Grade Variation Apple (*Malus sylvestris* Mill) in Apple Extract Drink Processing: A Review. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(3) : 939-949
- Hernani, N. 2009. *Aspek Pengeringan Dalam Mempertahankan Kandungan Metabolit Sekunder Pada Tanaman Obat*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian : Bogor
- Hidayat, F. K., Ulfa., dan K. D. Sofiana. 2015. Perbandingan Jumlah Makrofag Pada Luka Insisi *Full Thickness* Antara Pemberian Ekstrak Umbi Bidara Upas Dengan NaCl Pada Tikus Wistar Jantan. *Journal of Agromedicines and Medical Sciences* 1(1) : 9-12
- Irma, K. 2012. Pemberian Platelet Rich Plasma Topikal Meningkatkan Proses Regenerasi Jaringan Luka Pada Tikus Putih [Thesis]. Program Pascasarjana Universitas Udayana. Denpasar
- Junqueira, L.C. and J. Carneiro. 2005. *Basic Histology: text and atlas. 11st Edition*. McGraw-Hill's Access Medicine.
- Junquiera, L.C and J. Carneiro, 2007. *Basic Histology : text and atlas. 11 st edition*. McGraw-Hill's Access Medicine.
- Kartikaningtyas, A.T., Prayitno dan S.P. Lastiany. 2015. Pengaruh Aplikasi Gel Ekstrak Kulit *Citrus Sinensis* terhadap Epitelisasi pada Penyembuhan Luka Gingiva Tikus *Sprague Dawley*. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

- Knolle, P., H. Lohr, U. Treichel, H.P. Dienes, A. Lohse, J. Schlaack, and G. Gerkem. 1995. Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response. *Zeitschr Gastroenterol* 33:613-620.
- Kumar, V., A.K. Abbas, and N. Fausto. 2005. *Robins and Cotran : Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia : Elsevier Saunders Inc.
- Kurniati, I. 2012. Pemberian Platelet Rich Plasma Topikal Meningkatkan Proses Regenerasi Jaringan Luka Pada Tikus Putih [Thesis]. Universitas Udayana Denpasar
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mahandaru, D. dan Ishandono, D. 2012. The Effect Of Aloe Vera On Healing Process Of Incision Wound. *Jurnal Plastik Rekonstruksi* : Jakarta.
- Mescher, A. L. 2002. *Histologi Dasar Junqueira Teks & Atlas*. Penerbit Buku Kedokteran : EGC.
- Mulyata, S.T. 2002. Analisis Imunohistokimia TGF $\beta$ -1, Indikasi Hambatan Kesembuhan Luka Operasi Episiotomi Pada Tikus Sprague Dawley. *1<sup>st</sup> Indonesian Symposium on Obstetric Anaesthesia*. Bandung
- Naibaho, O.H., V.Y.Y Paulina, dan W.Weny. 2013. Pengaruh Basis Salep terhadap Formulasi Sediaan Salep Ekstra Daun Kemangi (*Omicum sanctum L.*) pada Kulit Punggung Kelinci yang dibuat Infeksi *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Farmasi UNSTRAT* 2(2) : 27-33
- Nareswari, N. 2011. Pembuatan Salep Minyak Atsiri Daun Jeruk Limau (*Citrus amblycarpa* (Hassk) ochse) Dan Uji Stabilitas Terhadap Tipe Basis Yang Digunakan. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Nur, N.N. 2017. Perbedaan Penyembuhan Luka Sayat Secara Makroskopis Antara Pemberian Topikal Ekstrak Sel Punca Mesenkimal Tali Pusat Manusia Dengan Gel Bioplacenton Pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague dawley* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung
- O'Malley, B. 2005. *Clinical Anatomy and Physiology of Exotic Species: Structure and Function of Mammals, Bird, Reptiles and Amphibians*. Elsevier Saunderson Publisher. Germany.
- Orsted, H.L., D. Keast, L. F. Lalanda, and M. Francoise. Basic Principles of Wound Healing. *Wound Care Canada*, 9(2) : 4-12
- Perdanakusuma, D., S. 2007. *Anatomi Fisiologi Kulit Dan Penyembuhan Luka*. Plastic Surgery Departement. Airlangga University School of Medicine – Dr. Soetomo General Hospital Surabaya – Indonesia.
- Plumb, D. C., 2008. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 6<sup>th</sup> ed. Wisconsin: Pharma Vet Inc.



- Pradata, A., D.P. Sari, I. Hadning, 2015. Formulasi Uji Stabilitas Fisik Sediaan Krim Ekstrak Biji Lengkek (*Euphoria longana* Lam.) Dengan Kombinasi Emulgator Alam. *Naskah Publikasi Karya Tulis Ilmiah*. Hlm : 1-16
- Primadani, Y.D. 2009. Formulasi Salep Minyak Atsiri Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) Basis Salep Lemak Dan PEG 4000 Serta Aktivitas Antifunginya Terhadap (*Candida albicans*) [Skripsi]. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Qomariah, S. 2014. Efektifitas Salep Ekstrak Batang Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli*) Pada Penyembuhan Luka Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) [Skripsi]. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang
- Sabir A..2003. *Pemanfaatan Flovanoid di Bidang Kedokteran Gigi*. Majalah Kedokteran Gigi. Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Airlangga, 81-87 : Surabaya.
- Setyoadi, D.D., dan Sartika. 2010. Efek Lumutan Daun Dewa (*Gynura Segetum*) Dalam Memperpendek Waktu Penyembuhan Luka Bersih Pada Tikus Putih. *Jurnal Keperawatan Soedirman (The Soedirman Journal of Nursing)* 5(3): 127-135
- Suckow. 2006. *The Laboratory Rat*. Second Edition. A volume in American College of Laboratory Animal Medicine. Hlm : 71-92.
- Sudrajat, I. 2006. Perbandingan dan Hubungan Skor Histologi CD8+ dan Rasio Skor Histologi CD4+/CD8+ di Sekitar Luka Dengan dan Tanpa Infiltrasi Levobupivakain Pada Penyembuhan Luka Pasca Insisi. Universitas Diponegoro Semarang.
- Sufrida., dan Maloedyn, S. 2006. *30 Ramuan Penakluk Hipertensi*. Edisi 1. Agromedia Pustaka : Jakarta
- Tahani, N.A. 2013. *Laporan Teknik Instrumentasi Laboratorium Biosistem (Hewan Coba)*. Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim : Malang.
- Tahir, Z. 2013. Pengaruh Analgesia Multimodal Epidural Bupivakain 0,125% Dan Parecoxib 40Mg Intravena Terhadap Ratio Kadar Antara Interleukin-6 Dengan Interleukin-10 Dan Intensitas Nyeri Pada Pembedahan Laparotomi Ginekologi [Thesis]. Program Pascasarjana Program Biomedik. Universitas Hasanuddin. Makassar
- Talley, D., J.D. Bancroft, and Stevens, A. 2011. *Theory and Practice of Histological Techniques : Fixation and Fixatives*. 3 rd Edition. Churchill Livingstone : Edinburgh, New York
- Triyono, B. 2005 Perbedaan Tampilan Kolagen Di Sekitar Luka Insisi Pada Tikus Wistar Yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain Dan Yang Tidak Diberi Levobupivakain [Thesis]. Program Magister Biomedik Dan PPDS I. Universitas Diponegoro : Semarang

- Tsala, D.E., D. Amadou, and S. Habtemariam. 2013. Natural Wound Healing and Bioactive Natural Products. *Phytopharmacology* 4(3) : 532-56.
- Velnar, T., T. Bailey, and V. Smrkolj. 2009. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *The Journal of International Medical Research*. 37: 1528-1542.
- Vykoukal, D. M., R. C. Peter., J. Vykoukal. 2009. Dielectric Characterization of Complete Mononuclear and Polymorphonuclear Blood Cell Subpopulations For label Free Discrimination. *J.Integr. Biol.* I : 477-484
- Williams, J. W. dan A. Moores. 2009. *BSAVA Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction*. London: BSAVA
- Wulandari, A. 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Buah Apel Manalagi Terhadap Bakteri *Salmonella thyposa*. *Jurnal Healthy Science*. Vol: 2 (1)
- Yanhendri, S. W. Y. 2012. Berbagai Bentuk Sediaan Topikal dalam Dermatologi. Bagian Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. *CDK-194* 39(6) : 423-429

